

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRECION BRONQUIAL:
ESTUDIO DE LA IGA
EN LA PATOLOGIA
PULMONAR**

**LUIS RODOLFO COLLADO YURRITA
1992**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRECION BRONQUIAL:
ESTUDIO DE LA IGA
EN LA PATOLOGIA
PULMONAR**

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE DOCTOR
EN MEDICINA Y CIRUGIA POR
LUIS RODOLFO COLLADO YURRITA

DIRECTOR: PROF. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND

MADRID, 1992

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, CATEDRATICO DE MEDICINA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA. U.C.M.


CERTIFICA: Que el Trabajo de Investigación titulado: "SECRECION BRONQUIAL: ESTUDIO DE LA IgA EN LA PATOLOGIA PULMONAR", esta realizado integramente por D. LUIS RODOLFO COLLADO YURRITA, bajo mi dirección y supervisión. Estoy conforme con los métodos y técnicas seguidos, así como con los resultados obtenidos. Se trata de un estudio que está bien estructurado sobre un tema de actualidad. Seune, por tanto, calidad suficiente como para proceder a su matriculación y posterior lectura como Tesis Doctoral.

Firmado en Madrid a veinticuatro de Junio de mil novecientos noventa y dos.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND
(fecha y firma)
D.N.I.: 3691587


Fdo.: D. CARLOS PEREZAGUA
(fecha y firma)
D.N.I.: 3691587

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO


DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMA: Que una vez examinado el Trabajo presentado por D. LUIS RODOLFO COLLADO YURRITA, titulado: "SECRECION BRONQUIAL: ESTUDIO DE LA IgA EN LA PATOLOGIA PULMONAR", dirigido por el Prof. Dr. D. Carlos Perezagua Clamagirand, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

El Director del Departamento

26-6-1992


Fdo.: D. Carlos Perezagua Clamagirand
(fecha y firma)
26-6-1992

A mis padres

A M^a Jose y Felisa

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. D. Carlos Perezagua Clamagirand, la dirección y apoyo que ha manifestado en la realización de esta Tesis así como, la ayuda que desde hace años me viene prestando sin la cual nada de esto hubiera sido posible. Le agradezco la confianza que ha depositado en mí y le expreso públicamente mi más sincera admiración.

A Felisa López Gonzalez, por su amistad y por haberme abierto las puertas que me han permitido llegar hasta aquí.

A la Dra Ciudad Cabañas, por el soporte informático y sobretodo por ayudarme a superar los momentos difíciles, permaneciendo junto a mí.

Al Dr. Sanz Esponera y a la Srta. Maribel por la iconografía facilitada para este trabajo.

A la biblioteca de la Facultad de Odontología de la U.C.M. y en especial a M^a Rosa Rodríguez Durantéz, por las facilidades en la obtención de la bibliografía de esta obra.

A mis amigas Pilar Nuñez Gragero, M^a Josefa Fontecilla Castillo, por la ayuda para solucionar los problemas burocráticos surgidos en la realización de esta Tesis.

INDICE

	<u>paginas</u>
1.- Justificación del trabajo, hipótesis y objetivos.....	1
2.- Introducción.....	6
3.- Bases de conocimiento.....	8
3.1 - Recuerdo anatomofisiológico de la secreción bronquial.....	8
3.1.1 - Aparato mucosecretor.....	9
-. células secretoras epiteliales	
-. células secretoras glandulares	
3.1.2.- Síntesis y Control de la secreción bronquial.....	26
-. Biosíntesis de las mucinas bronquiales	
-. Control de la secreción bronquial	
3.1.3.- Composición bioquímica de la secreción bronquial.....	31
-. Fase espumosa	
-. Fase acuosa	
-. Fase mucofibrilar	
3.1.4 - Propiedades y Funciones de la secreción bronquial.....	43
3.2. - Inmunología de las mucosas.....	52
3.2.1.- Inmunoglobulinas Secretorias.....	53
-. Estructura general de las Inmunoglobulinas	
3.2.2.- Inmunoglobulina A (IgA).....	61
3.2.2.1.- Estructura de la IgA.....	62
-. Componente Secretor de la IgA (CS)	
-. Cadena J	
3.2.2.2.- Síntesis de la IgA en las mucosas.....	73
-. Sistema TLRM	
-. Ciclo celular de la IgA	
-. Captación del Ag y maduración de los Linfocitos B	
-. Células Plasmáticas	
-. Biosíntesis cadenas H y L de la IgA	

3.2.2.3.-	Secreción de la IgA en las mucosas.....	112
3.2.2.4.-	Propiedades y Funciones de la IgA.....	115
3.3. -	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (E.P.O.C.).....	120
3.3.1.-	E.P.O.C.-Bronquitis Crónica.....	127
-.	Etiología	
	Tabaco	
	Contaminación ambiental	
	Infección	
	Profesión	
	Factores genéticos	
-.	Patogenia	
-.	Anatomía Patológica	
3.3.2.-	Modificaciones de la secreción bronquial en la Bronquitis Crónica.....	140
3.3.3.-	Diagnostico precoz de la Bronquitis Crónica.	144
3.4.-	Cancer de Pulmón.....	147
3.4.1.-	Carcinoma Pulmonar.....	149
-.	Etiología	
	Tabaco	
	Otros agentes etiológicos	
-.	Anatomía Patológica	
	C. Epidermoide	
	Características biológicas	
	Adenocarcinoma	
	Características biológicas	
	C. células pequeñas	
	Características biológicas	
	C. células grandes	
	Características biológicas	
3.4.2.-	Modificaciones de la secreción bronquial en el Carcinoma Pulmonar.....	175
3.4.3.-	Diagnostico precoz del carcinoma de pulmón.	176
3.5.-	Cuantificación de Inmunoglobulinas.....	182
3.5.1.-	Inmunodifusión.....	189

3.5.2.- Inmunodifusión Radial Simple (RID).....	193
-. Técnica	
-. Materiales	
-. Preparación de reactivos	
-. Preparación placas de Inmunodifusión	
-. Obtención de Curvas Estandar	
4.- Material y Métodos.....	206
4.1. - Sujetos estudiados.....	206
4.2. - Material Físico.....	211
4.3. - Métodos empleados.....	212
4.3.1.- Lavado Broncoalveolar.....	212
4.3.2.- Obtención de Esputo.....	214
4.3.3.- Procesamiento de las muestras.....	216
4.3.4.- Inmunodifusión Radial.....	217
4.3.5.- Método de Lowry.....	222
4.4.- Protocolo de recogida de datos.....	225
4.5.- Planteamiento del Estudio.....	226
4.6.- Método Estadístico.....	227
5.- Resultados.....	229
5.1.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Grupo Control y Patológico.....	229
5.2.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Grupo Control, según presente o no hábito de fumar.....	230
5.3.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo E.P.O.C.....	231
5.3.1.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo E.P.O.C., según presentase o no Cor Pulmonale.....	231
5.3.2.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo E.P.O.C., según presente o no hábito de fumar.....	232

5.4. - Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo de Neoplasia Pulmonar.....	232
5.4.1.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo Neoplasia, según el tipo histológico de Neoplasia.....	235
5.4.2.- Resultados en la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo Neoplasia, según presente o no Cor pulmonale.....	235
5.4.3.- Resultados en la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo Neoplasia, según presente o no hábito de fumar.....	236
5.4.4.- Resultados en la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo Neoplasia, según presente o no asociado un cuadro de E.P.O.C.....	236
5.5.- Resultados de la determinación de [IgA/Pt] en el Subgrupo E.P.O.C. y Neoplasia.....	237
5.6.- Correlación de [IgA/Pt] con los parametros edad, sexo, tabaco. etc.....	237
6.- Discusión.....	258
6.1.- Discusión del método empleado.....	258
6.1.1.- Lavado Broncoalveolar.....	258
6.1.2.- Obtención de Esputo.....	261
6.1.3.- Inmunodifusión Radial Simple (RID).....	267
6.1.4.- Técnica de Lowry.....	279
6.2.- Discusión de los resultados.....	283
6.2.1.- Niveles de IgA en el moco bronquial de los sujetos Control.....	289
6.2.2.- Niveles de IgA en las enfermedades broncopulmonares estudiadas.....	297
6.2.2.1.- [IgA/Pt] en moco bronquial: E.P.O.C.....	297
- E.P.O.C.- Tabaquismo	
- E.P.O.C.- Cor Pulmonale	

6.2.2.2.- [IgA/Pt] en moco bronquial:	
Neoplasia Pulmonar.....	310
-. Tipo Histológico	
-. Neoplasia - Tabaquismo	
-. Neoplasia - Cor Pulmonale	
-. Neoplasia - E.P.O.C.	
6.2.3.- [IgA/Pt] en moco bronquial:	
E.P.O.C.- Neoplasia.....	327
6.2.4.- [IgA/Pt] en moco bronquial:	
edad y sexo.....	329
7.- Conclusiones.....	330
8.- Bibliografia.....	335

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

**1.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO.
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.**

1.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO: HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hace más de 25 años, Tomasi et al¹, demostraron que en las secreciones de los tejidos mucosos del organismo, la IgA era la inmunoglobulina más abundante.

Desde entonces, mucho se ha discutido sobre el origen y la estructura de dicha Inmunoglobulina; hoy en día se acepta como evidente^{1,2,3,4,5} que existen dos subtipos o clases de IgA, separables por gradientes de *sucrosa*.^{1,2} Una con un coeficiente de sedimentación 7S, la IgA monomérica, y otra la IgA dimérica o IgA 11S, aparte de una mínima cantidad de IgA polimérica^{1,2} o 16S.

En cuanto a estos subtipos de IgA, igualmente está demostrado en la literatura existente, que la IgA monomérica se encuentra, de forma mayoritaria, en el suero, mientras que la IgA dimérica es predominante en las secreciones.⁶

Por lo que se refiere a la fracción 11S de la IgA, su peculiar estructura, en la que se encuentra presente una formación proteica denominada *componente secretor*, le permite permanecer en las secreciones mucosas sin ser destruida por las enzimas proteolíticas presentes en las mismas.

Su función principal, es intervenir en los mecanismos de defensa humoral e igualmente participar en el mantenimiento de las propiedades físico-químicas de las secreciones mucosas⁷.

En cuanto a su origen, hoy en día se acepta que la fracción 11S de la IgA o IgA secretoria (S-IgA) tiene su lugar de producción en las células plasmáticas situadas en la lámina propia de los tejidos mucosos⁸.

Las secreciones bronquiales, al igual que las de otras áreas mucosas del organismo, se caracterizan por poseer una misión de defensa y barrera contra las agresiones del exterior⁹. Su síntesis y composición están influenciadas por todas aquellas circunstancias que puedan alterar de una manera u otra la superficie secretora de las vías aéreas. De entre estas circunstancias cabe mencionar, por su elevada frecuencia en la práctica clínica diaria, las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y las neoplasias pulmonares primarias y/o metastásicas¹⁰.

Las alteraciones que ambos tipos de procesos broncopulmonares ocasionan en las secreciones bronquiales, afectan tanto a la composición como a las propiedades físicas de las mismas.

Por lo que se refiere a la composición química de dichas secreciones, la alteración más frecuente son variaciones en la matriz proteica, generalmente consistentes en un aumento de la misma debido al paso de proteínas desde el plasma, secundario, a los fenómenos de vasodilatación y edema mucoso.

Sobre las variaciones que se producen en la concentración de IgA en los procesos broncopulmonares antes mencionados, puede decirse que en la literatura al respecto existen importantes y fuertes contradicciones; hay autores que consideran que en ese tipo de procesos se debe producir una disminución en la concentración de la IgA 11S, debido al deficit en la síntesis del *componente secretor* que, como consecuencia de la destrucción mucosa que acompaña a estos procesos broncopulmonares, se produce.

En el punto opuesto a estas ideas, se encuentran otros autores que consideran que en estas enfermedades pulmonares se produce un aumento de la IgA, como consecuencia de los fenómenos de transudación plasmática secundarios a la vasodilatación y edema mucoso que acompaña a las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas y a las neoplasias pulmonares.

Por otra parte, no existe aún una metodología uniforme en la obtención de las muestras y en la determinación cuantitativa de la IgA, lo que hace realmente difícil comparar los resultados de los estudios de distintos centros. Hoy en día este problema se ha pretendido solucionar mediante la edición de una serie de normas internacionales¹¹ para la cuantificación de inmunoglobulinas por la técnica de Inmunodifusión Radial, por ser ésta una técnica de fácil manejo, bajo coste y resultados aceptables.

No obstante, y hasta que estas normas sean aceptadas universalmente, cada grupo de trabajo debe dar validez y rentabilidad a su técnica estableciendo unos parámetros de normalidad de IgA en las secreciones bronquiales en su medio, que le permitan contrastar los resultados obtenidos en la población enferma, así como conocer las causas más frecuentes en que esta concentración de IgA se presenta alterada, para poder establecer un diagnóstico diferencial y valorar su significado.

La hipótesis de este estudio se desprende de las consideraciones anteriores. Sabemos que la IgA está presente en la composición de las secreciones y, por lo tanto, debe alterarse cuando se alteran éstas, cosa que ocurre en los

cuadros de enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en las neoplasias pulmonares, sean éstas primarias y/o secundarias.

Por consiguiente nuestra hipótesis es que la concentración de IgA, según se trate de sujetos sanos o de pacientes con Bronquitis Crónica y/o pacientes con Neoplasia pulmonar, es significativamente distinta en los pacientes afectados bien por E.P.O.C., bien por Neoplasia pulmonar o bien por ambas enfermedades, respecto de la población control (sana).

El objetivo principal de este trabajo es confirmar que existe una diferencia significativa en los niveles de concentración de IgA entre los grupos antes mencionados.

El segundo objetivo es justificar esta diferencia por fenómenos de síntesis local de la IgA.

Nuestro tercer objetivo es establecer algún tipo de correlación entre los niveles de IgA encontrados con factores que pudieran influir sobre ellos tales como el tabaco o la insuficiencia cardíaca.

Como cuarto y último objetivo pretendemos estudiar la posible utilidad de estas determinaciones como método de diagnóstico precoz de ambas entidades broncopulmonares.

2. - INTRODUCCION

2.- INTRODUCCION

La accesibilidad del tracto respiratorio para la obtención de muestras de sus secreciones, bien mediante la técnica de expectoración o por lavado broncoalveolar (LBA), ha sido un potente estímulo para el estudio, ya los médicos asirios hace 3000 años¹², analizaban el producto de la expectoración para estudiar la estructura pulmonar. Galeno también analizaba las secreciones bronquiales como material de estudio del árbol bronquial¹³, permitiéndole ello el seguimiento de distintos procesos broncopulmonares.

A lo largo de los siglos, las técnicas de estudio de las secreciones bronquiales se han ido perfeccionando y hoy en día ya es posible estudiar, no solamente el aspecto físico, sino también su composición bioquímica, lo cual ha permitido analizar el comportamiento cinético de las proteínas presentes en dichas secreciones.

De entre esas proteínas, la más estudiada en los últimos 25 años ha sido la inmunoglobulina IgA¹⁴, dadas las importantes funciones que desempeña tanto en la defensa como en el mantenimiento de las propiedades de las superficies mucosas del organismo.

En este contexto, el presente trabajo se diseñó para valorar la concentración de IgA secretoria en las secreciones bronquiales de sujetos sanos y patológicos, con el fin de analizar y evaluar las diferencias existentes entre ambos grupos, y así arrojar alguna luz sobre los mecanismos implicados en las variaciones de la concentración de dicha inmunoglobulina y establecer la utilidad clínica en la práctica diaria; dado la sencillez y la economía de las técnicas de determinación que aquí se aplicarán.

3. - BASE DE CONOCIMIENTO

3.- BASES DE CONOCIMIENTO

3.1.- RECUERDO ANATOMOFISIOLOGICO DE LA SECRECION BRONQUIAL

La fisiología normal y fisiopatología de la producción de fluidos en el tracto respiratorio son temas relativamente recientes en la medicina pulmonar. Sólo durante los últimos años los investigadores han centrado su atención en los mecanismos y en la regulación de la secreción de las vías aéreas.

La función principal de estas secreciones es la limpieza mucociliar. Siendo ésta el principal mecanismo defensivo pulmonar para eliminar las partículas inhaladas.

La secreción bronquial esta compuesta por una compleja mezcla de productos, muy variable en sentido cualitativo y cuantitativo, cuya producción depende del *Aparato Mucosecretor* (fig.1), repartido en múltiples elementos a lo largo de las paredes de las vías aéreas. Esta mezcla heterogénea se difunde por encima de la superficie de la luz del árbol traqueobronquial y por medio de la actividad ciliar es propulsada hacia arriba, hasta llegar a la cavidad oral donde normalmente es deglutida.

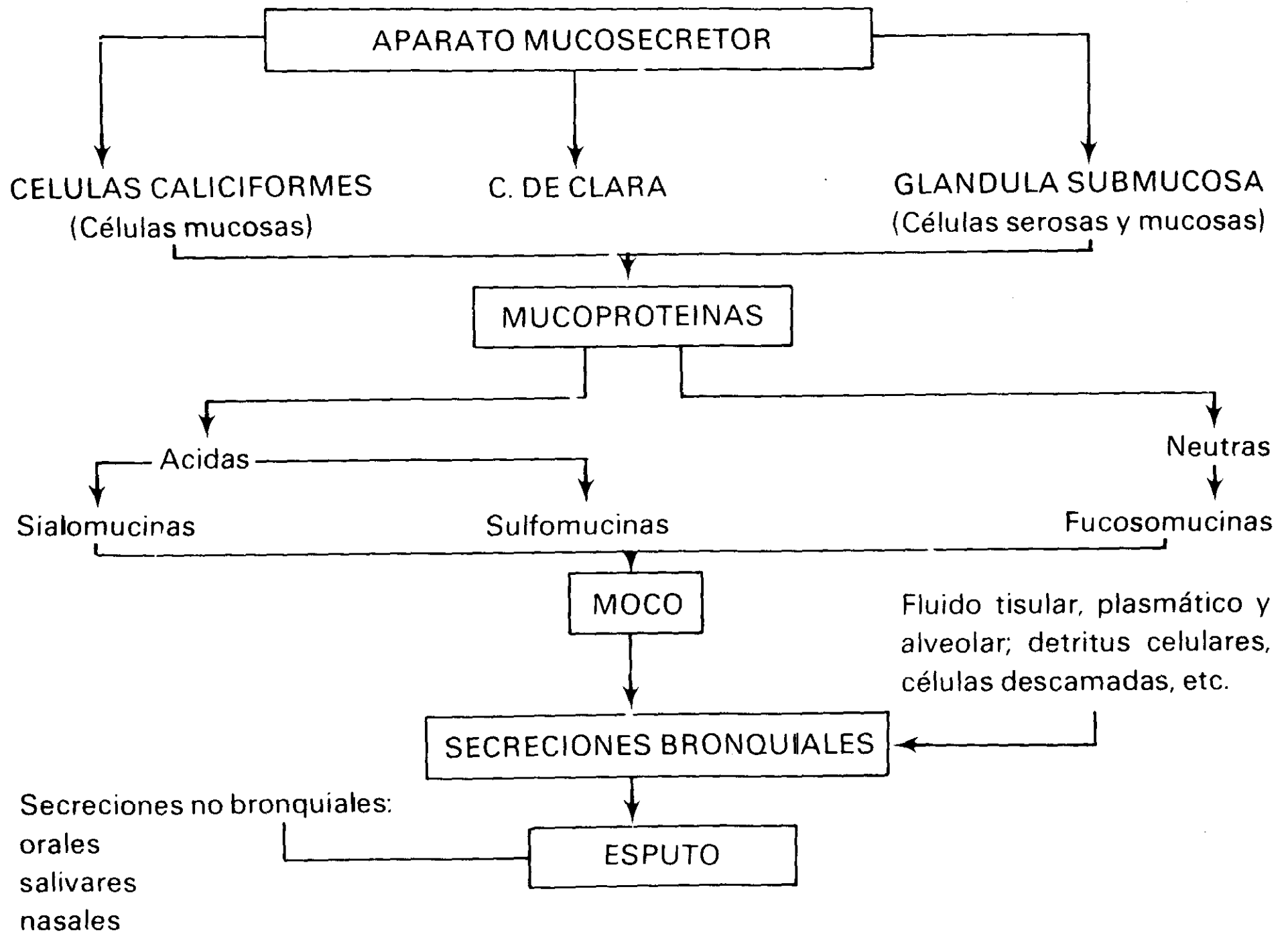
Se estima que el volumen de secreción mucosa respiratoria en un adulto sano oscila entre 10-100 cc/día¹⁵.

Esta secreción bronquial en condiciones normales no llega al exterior, debido a los mecanismos de deshidratación y reabsorción que se producen a nivel de la mucosa y de la cavidad oral; ahora bien en las situaciones patológicas que cursan con fenómenos de flogosis crónica de la mucosa, esta secreción no puede ser reabsorbida en su totalidad y en parte es eliminada al exterior mezclada con la saliva, formando junto a ésta última lo que comúnmente se conoce como expectoración¹⁶.

3.1.1. APARATO MUCOSECRETOR

El aparato mucosecretor de las vías aéreas se encuentra extendido por el espesor de la pared traqueal, bronquial y bronquiolar, y sus células específicamente diferenciadas en parte se intercalan con las células epiteliales de revestimiento, y en parte se despliegan por la submucosa bajo forma de glándulas *acinosas* y *tubuloacinosas*.

FIGURA 1.- Esquema del Aparato Mucosecretor y de la constitución de las secreciones bronquiales.



El revestimiento de las vías aéreas respiratorias está constituido de forma predominante por un epitelio cilíndrico, ciliado y pseudoestratificado, en el que todas sus células están adheridas a la membrana basal, pero no todas alcanzan la luz¹⁷(fig.2).

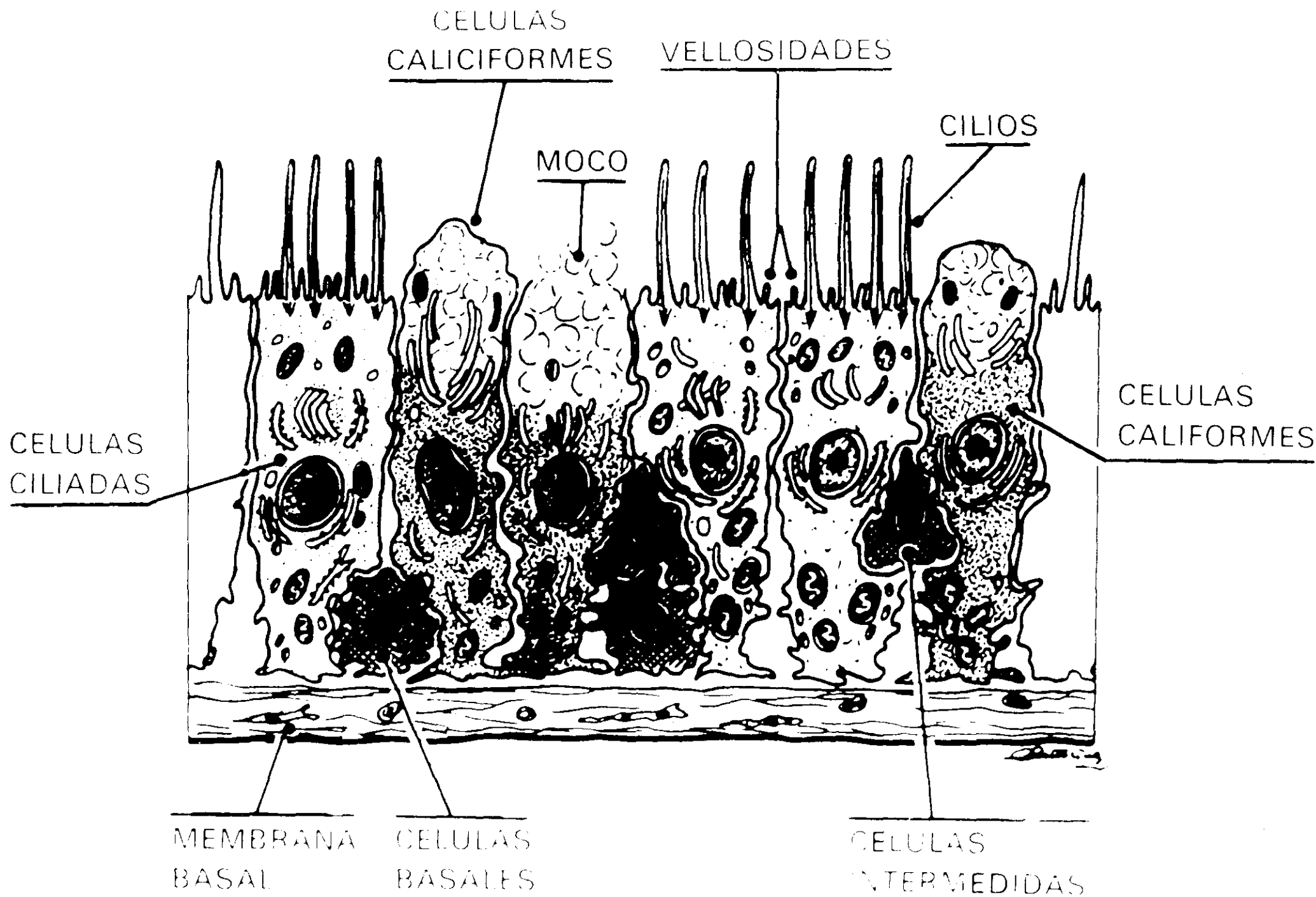
Según nos desplazamos hacia las vías aéreas más periféricas este epitelio va disminuyendo de grosor hasta convertirse en un epitelio monoestratificado cúbico, más que cilíndrico, hasta convertirse en el epitelio alveolar.

En conjunto este epitelio de revestimiento esta formado por las siguientes células¹⁸:(fig.3 y 4)

- *Células basales*
- *Células de Kulchitsky.*
- *Células intermedias*
- *Células ciliadas*
- *Células con pestañas o en cepillo*
- *Células caliciformes*
- *Células serosas*
- *Células de Clara*

Por lo que se refiere a estos ocho tipos celulares¹⁹ únicamente participan en la actividad mucosecretora las células de tipo *seroso, mucoso o caliciformes* y las *de Clara*, caracterizadas todas ellas por poseer gránulos secretores en su citoplasma.

FIGURA 2.- Sección longitudinal del epitelio
bronquial



En cuanto a los otros tipos celulares vienen a representar el 70% del conjunto celular epitelial de las vías aéreas y se caracterizan básicamente por:

-. *Célula de Kulchitsky*(1): Son células que contienen numerosos gránulos neurosecretorios y forman parte del sistema APUD (descarboxilación y captación de precursores de aminas) para la formación de péptidos activos. Estas células son más numerosas antes del nacimiento¹⁸.

-. *Célula Basal*(2): Son las células progenitoras del sistema de defensa externo del pulmón. Una de sus caras está aplanada contra la membrana basal y la otra hace protusión por encima del núcleo dando lugar a un perfil que en los cortes histológicos aparece como un montón de tierra con los bordes suavizados. Estas células son las que intervienen en el fenómeno de regeneración del epitelio después de cualquier agresión sobre el mismo.

-. *Célula intermedia*(6): De citoplasma traslucido, contienen un abundante retículo endoplasmático rugoso, un aparato de Golgi importante y poco más puede decirse de ellas salvo que seguramente son un estadio intermedio en la maduración celular¹⁷.

- . *Célula con pestañas o en cepillo*(7): Es parecida a la célula similar que existe en el intestino pero su función en el árbol respiratorio es desconocida.¹⁸

- . *Célula ciliada*(8): Como su nombre indica se caracteriza por presentar cilios en su superficie luminal; estas células presentan una membrana plegada con un área superficial enorme, debido a los cilios, existiendo entre estos últimos gran cantidad de vellosidades semejantes a los microvellosidades del intestino, por lo cual también pudiera ser que intervengan en fenómenos de absorción de agua y sales¹⁷. Los cuerpos basales de los cilios forman una empalizada por debajo de la membrana de la célula; las raicillas que se extienden desde estos cuerpos llegan hasta una zona rica en mitocondrias, entre estas y por debajo de ellas es fácil localizar lisosomas, junto a estos últimos suelen existir zonas ricas en aparato de Golgi.

Estas células dinámicas de las vías aéreas suelen tener unos 200 cilios en su superficie, proyecciones semejantes a pelos, con una longitud de entre 5-6 micras y un diámetro de 0.2-0.3 micras. Estos cilios están formados por 9 pares de fibras ó *Axonemas* y un par central, rodeado todo ello por una membrana prolongación de la membrana de la célula ciliada.

Estos axonemas están a su vez, constituidos por una proteína estructural (Tubulina) de un P.M. de aproximadamente 55.000 daltons que forma el 99% del axonema y el 1% restante está formado por una enzima proteica del tipo ATP asa.¹⁷

Células secretoras epiteliales

Como ya mencionamos antes, del epitelio pseudoestratificado que recubre las vías aéreas únicamente una pequeña parte (25-30%) participa en las funciones de secreción bronquial. Esta porción celular está formada por las células serosas, las mucosas o caliciformes, y las células de Clara.

- . *Célula serosa*(3): Es de aspecto parecido a la existente en las glándulas submucosas, contiene pequeños y discretos gránulos electrodensos. Sólo se han identificado con seguridad en la rata y en el feto humano¹⁸, sin que se haya podido confirmar su existencia en el hombre adulto.

- . *Célula mucosa o caliciforme*(4): También denominadas "*globet cells o células en copa*", son muy numerosas en la traquea y en los grandes bronquios, donde la relación "célula caliciforme/célula ciliada" es de 1:5.

FIGURA 3.- Epitelio bronquial de revestimiento de las vías altas con células caliciformes, algunas con actividad secretora, alternadas con células ciliadas.

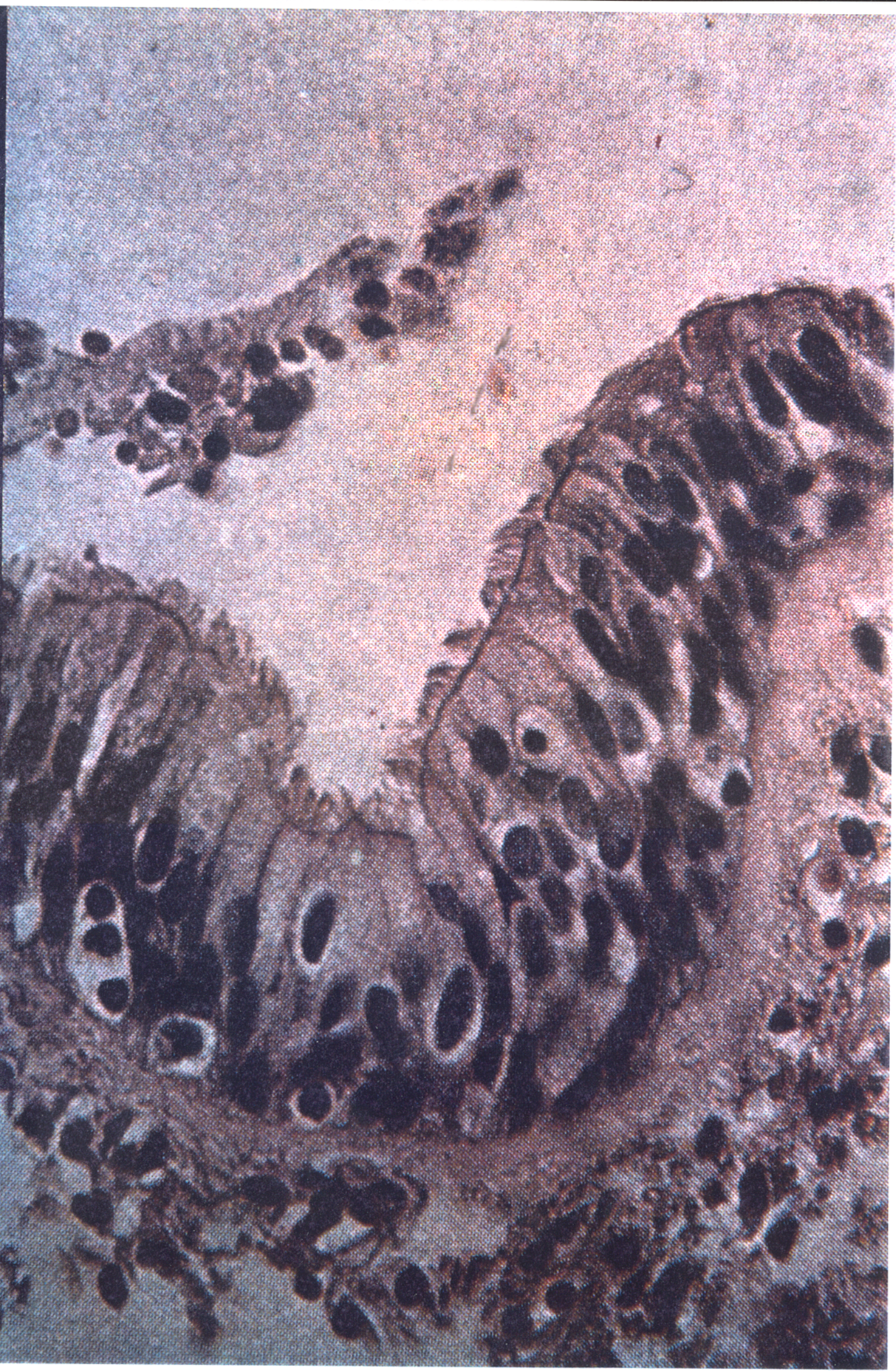
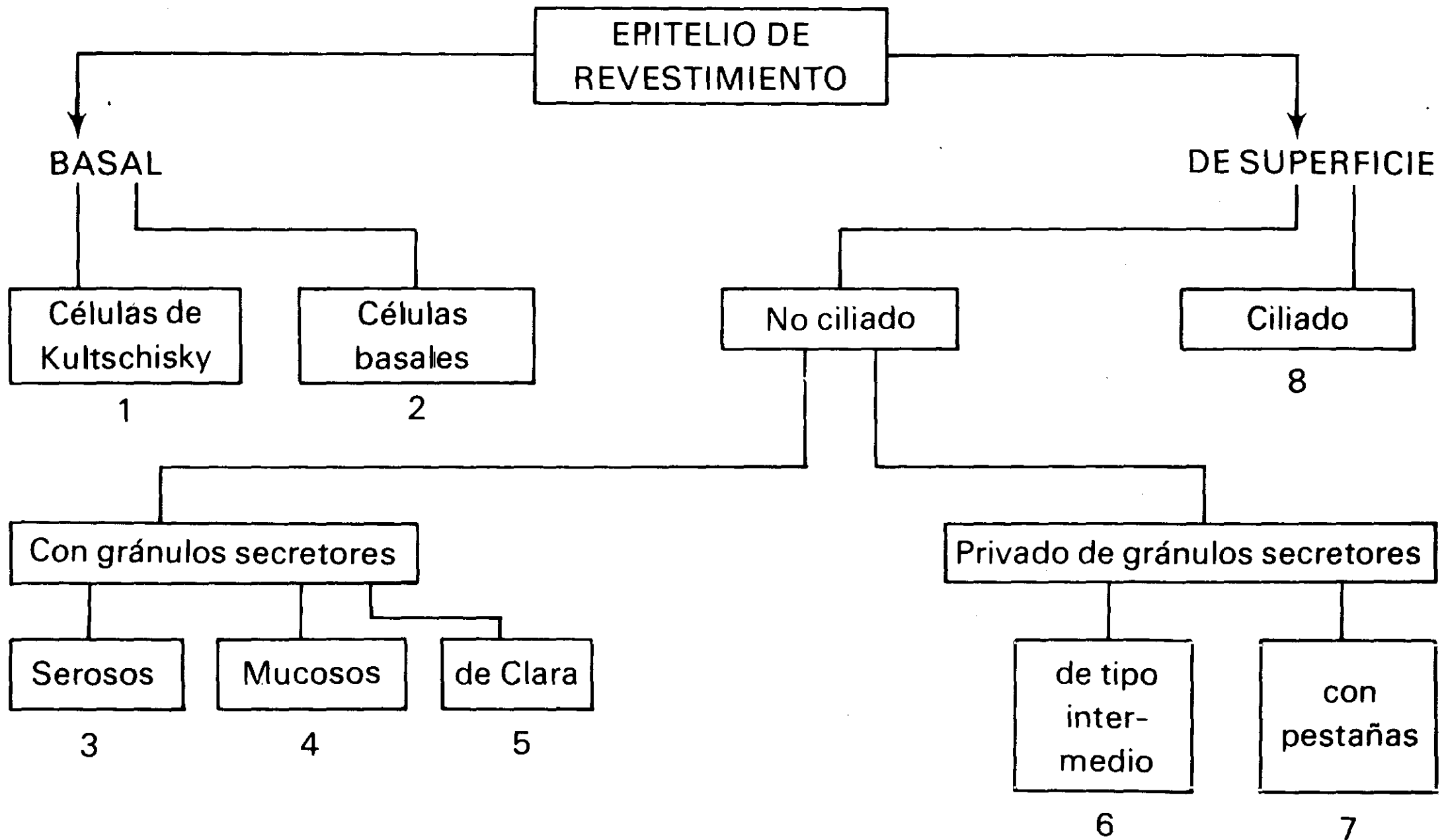


FIGURA 4.- Epitelio de revestimiento de las vías aéreas y células mucosecretoras. (de Jones y Reid, 1978, modificado)



Procediendo en sentido distal la relación se modifica progresivamente a favor de las células ciliadas, siendo de (1:25-1:30) en los bronquiolos cartilagosos más distales, mientras que en el interior del lóbulo, es decir, a nivel bronquiolar su presencia se hace esporádica y llegan a desaparecer por completo en la zona distal del bronquiolo terminal¹⁹.

Al microscopio electrónico, aunque, en conjunto presentan una apariencia cilíndrica, semejante a la de las células ciliadas, su aspecto real es en "*barrel shaped*"¹⁹, es decir en forma de barril, con una parte central más ancha que los extremos (fig.5).

Su histología se caracteriza por la presencia en el citoplasma de pequeñísimos gránulos secretores dotados de una típica luminosidad electrónica y confluentes entre si a causa de la fusión de las membranas granulares respectivas. Su diámetro oscila entre 300-1.800 micras. Tienden a trasladarse hacia el polo externo de la célula, empujando a veces el contorno hacia el exterior.

El núcleo de la célula caliciforme está en posición basal y se encuentra rodeado de un aparato de Golgi notablemente

desarrollado, también se encuentran imágenes de retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado.

En condiciones normales el número de células caliciformes es de aproximadamente 6.800 por mm^2 . pudiendo aumentar hasta 100.000 por mm^2 en casos de bronquitis crónica²⁰, etc...

Las investigaciones¹⁹ han confirmado que es en el retículo endoplasmático rugoso donde tiene lugar la síntesis del componente proteico de la mucina, esta armadura proteica pasa posteriormente al aparato de Golgi donde se ligan los hidratos de carbono, especialmente glucosa, y donde tiene lugar la hidratación y sulfatación para finalizar la síntesis mucígena.

La vida media de las células caliciformes no se conoce¹⁹, pero las membranas de los sáculos que contienen el moco se fusionan con la membrana apical de la célula y descargan su mucinógeno que se transforma en moco. Así, la célula no se descompone durante la secreción, sino que libera la mucina sáculo por sáculo²¹, probablemente de forma intermitente.(fig.5)

Según algunos autores²² una célula caliciforme puede realizar dos ciclos completos de síntesis y vaciamiento, quedando después destruida y siendo fagocitada posteriormente por los macrófagos alveolares.

FIGURA 5.- Células caliciformes aflorando a la luz
bronquial (4.400 x).



Algunos sáculos secretorios contienen una gota de material que se combina con *tetraóxido de osmio* haciendose densa para los electrones, en contraste con la mucina que no es densa, por lo que se piensa que este material puede ser un lípido.

Una de las características más notable de la morfología de las células caliciformes es su capacidad de proliferación en respuesta a la irritación por la lesión epitelial. En el hombre la proliferación de estas células se observa en forma característica en los fumadores de cigarrillos y en los pacientes con bronquitis crónica²⁰.

Las células caliciformes muestran estadios diferentes de actividad y madurez²³. Durante el proceso de maduración, las gotas de secreción se hallan al principio delimitadas por una membrana sencilla, que se va haciendo más fina a medida que avanza la maduración hasta que acaba por rasgarse. Así las gotas de secreción acceden a la luz bronquial cuando la membrana celular se rompe, y forman un tapón de secreción que llega a la fase de gel de la capa de secreción mucosa¹⁹.

Hay que precisar que habitualmente se definen como células caliciformes aquellos elementos que aparecen histológicamente como hiperextendidos por numerosos gránulos secretores y por ello a punto de volcar su contenido en la luz bronquial²⁴.

En realidad algunas otras células contienen cantidades mucho menores de gránulos y por ello se identifican peor como células mucosecretoras tanto al microscopio óptico como al electrónico.

- . *Células de Clara*: Descritas en 1937 por M. Clara, son unas células distales específicas, situadas sobretudo a nivel del bronquiolo²⁵. Se encuentran intercaladas en el epitelio cilíndrico bajo o cúbico, ciliado o no, que se extiende en una única capa a lo largo de las vías aéreas periféricas.

Las células de Clara son de mayor altura que las células cúbicas ciliadas de revestimiento, puesto que sobresalen a la luz bronquial como una formación papilar²⁶.

Las informaciones más detalladas²⁴ sobre sus características morfofuncionales provienen de la microscopía y de la observación microelectrónica, en este sentido es muy significativa la presencia de un abundante retículo endoplasmático liso y de numerosos elementos mitocondriales redondeados, extensamente distribuidos por el citoplasma y con frecuencia flanqueados por cuerpos laminares osmiófilos¹⁷.

Es un hecho comprobado y aceptado^{25,26} que las células de Clara desempeñan una función secretora apocrina, bien porque

produzcan una secreción mucosa glicoproteica, como la de las células caliciformes, o bien porque la secreción sea lipoproteica, como la de los neumocitos tipo B, identificables con el surfactante endoalveolar.

Por otra parte hay que recordar que las *células de Clara* y las células alveolares del tipo B, o del tipo II, muestran muchas analogías morfológicas y químicas²⁴. Esto ha suscitado la idea^{27,28,29} de que una sola célula progenitora pudiera dar origen a diversos tipos celulares diferenciados en las vías aéreas. Así, es posible demostrar experimentalmente que las *células de Clara* pueden dar origen a células caliciformes por la acción de estímulos farmacológicos irritativos²⁶.

Recientes observaciones de microscopia electrónica²⁴ han demostrado que existen situaciones de transición tanto entre las células serosas glandulares y las células caliciformes como entre estas últimas y las de Clara.

Células secretoras glandulares

El aparato *glandular mucosecretor* se encuentra diseminado en la submucosa de las paredes traqueal y bronquial, entre la membrana basal del epitelio superficial y la túnica

fibrocartilaginosa, consiguiendo a veces desbordan este último plano a través de los espacios intercartilaginosos¹⁷.

Se trata de formaciones tubulares o tubuloacinosas presentes únicamente en las vías aéreas de estructura cartilaginosa, constituidas por células de secreción mucosa, serosa o mixta, unidas a un conducto excretor, de un diámetro de 65-90 micras y de una longitud de 300-350 micras, que se abre a la luz bronquial entre las células epiteliales de superficie²⁴.

El epitelio del conducto excretor es de tipo ciliado, no secretor y muy similar en sus aspectos estructurales y dotación mitocondrial, al de los conductos excretores de las glándulas lacrimales o salivares. Se piensa¹⁸ que es precisamente a este nivel donde se realiza la regulación de los componentes hídricos y electrolíticos de la secreción bronquial³⁰.

El aparato glandular ocupa casi una cuarta parte del espesor total de la submucosa¹⁹. Esto confirma los estudios de Reid et al²⁸ en los cuales calculó que la relación entre el espesor de los tejidos ocupados por formaciones glandulares y el espesor de la pared bronquial, desde la membrana basal hasta la lámina pericondral, corresponde en condiciones normales a un índice de 0.25-0.26, y denominó a esta relación *índice de Reid*.

En condiciones patológicas, que conlleven una marcada hiperplasia glandular, los valores del índice de Reid tienden a aumentar aproximadamente a la unidad²⁸.

La proporción entre glándulas de secreción mucosa y de secreción serosa es de 1:1, calculandose que existe una glándula por cada mm² ²⁸.

Una de las características de las células glandulares es la de contener en el citoplasma numerosos gránulos secretores de tipo mucoso, seroso o mixto, identificables como glicoproteínas sintetizadas en el interior de la célula²².

Con los métodos histoquímicos combinados "Alcian Blau-Acido periódico (PAS)", es posible identificar varios tipos de glicoproteínas. Los cuatro principales están representados por: glicoproteínas neutras, sialoglicoproteínas en las que el ácido siálico es sensible a las neuraminidasas²², sulfoglicoproteínas y sialoglicoproteínas en las que el ácido siálico es resistente a las neuraminidasas.

Los mismos grupos se reconocen en el material segregado fuera de la célula.

Es poco conocida la cronobiología de la actividad secretora glandular, la cual parece desarrollarse según relaciones cuantitativas proporcionales a la masa glandular misma.

En los casos de flogosis crónica de los grandes bronquios, se establece una hiperplasia marcada de las glándulas tubuloacinosas y un correspondiente incremento en la producción de moco, sobre la base de un enorme desarrollo de las formaciones tubuloacinosas y de una notable dilatación de los conductos excretores³¹.

3.1.2.- SINTESIS Y CONTROL DE LA SECRECION BRONQUIAL

El conocimiento de las distintas modalidades de síntesis de los componentes de la secreción bronquial en las células caliciformes y en las glándulas tubuloacinosas es de fundamental importancia para la comprensión de los sucesos fisiopatológicos que clínicamente se manifiestan por el síntoma de "*Hipersecreción Bronquial*"²¹.

Biosíntesis de las mucinas bronquiales

La biosíntesis de los diferentes componentes de la mucina no está definida con absoluta certeza, sin embargo con los medios

autorradiográficos ($S_{35}O_4$) y de fraccionamiento celular, ha sido posible definir la "secuencia del montaje" bioquímico que en esquema se desenvuelve en tres fases³².

La síntesis de la porción proteica tiene lugar en los ribosomas del retículo endoplasmático, donde se transcribe el mensaje del RNA mensajero.

Desde aquí, el armazón proteico pasa al aparato de Golgi, donde tiene lugar la conjugación con los carbohidratos en posición lateral y según un orden preciso, establecido de antemano y definido por las transferasas presentes sobre la membrana del retículo endoplasmático liso y rugoso, y por el aparato de Golgi.

La síntesis mucígena se completa, más adelante, en las vacuolas del aparato de Golgi, donde se desarrollan los procesos de hidratación y eventual sulfatación. El fucósido y el ácido siálico, por ejemplo, que representan los grupos finales de las cadenas laterales glicoproteicas, se incorporan a la molécula con regularidad, mediante la acción de las transferasas del aparato de Golgi^{21,22,32}.

La N-acetilgalactosamina es el primer azúcar que se une a los residuos de *serina* y *treonina* de la cadena proteica, pero

todavía no se ha definido exactamente en que lugar ocurre el proceso. Se piensa que tal unión se produce durante el alargamiento de la cadena proteica y cuando entra en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso³².

Los demás azúcares de las cadenas laterales (*galactósido* y *N-acetilglucosamina*) y los grupos terminales (*galactósido*, *fucósido* y *N-acetilgalactosamina*) se ligan al eje proteico durante su paso por el aparato de Golgi, también a esta altura se produce la unión de los grupos sulfato³² con la finalidad de formar la molécula completa de mucina.

Se ha demostrado^{21,32}, que la composición de los grupos terminales en el hombre, está regulada por los genes de los grupos sanguíneos (*A*, *B*, *H*, *Se*, *Le^a* y *Le^b*). Se ha visto que los sujetos con genes *Se* segregan glicoproteínas que posee la misma antigenicidad que los glicolípidos presentes sobre la superficie de los eritrocitos.

Hay que subrayar, por otro lado, que la actividad de algunas transferasas, *licosil transferasa*, aparece localizada en los primeros elementos del aparato de Golgi, en las cisternas más inmaduras, y la de las demás transferasas, *sulfotransferasas*, que catalizan las últimas etapas de la síntesis glicoproteica, en los elementos más maduros.

Estas observaciones³² hacen pensar en la existencia de un "gradiente" de actividad de las transferasas; es verosímil pues pensar que el eje proteico al atravesar el aparato de Golgi, encuentre un cierto número de transferasas, capaces de "leer" los grupos residuales específicos de la proteína y añadir, tras una cuidadosa identificación del precursor, un residuo glucosídico cada vez.

En base a esta idea resulta natural pensar en la posibilidad de una "regulación" enzimática de la cantidad y del tipo de glicoproteínas que pueden ser segregadas por la mucosa bronquial^{31,32}.

Control de la secreción bronquial

Se desconoce en gran parte los estímulos fisiológicos que regulan la secreción de las macromoléculas por las células de la mucosa bronquial. La estimulación de los nervios simpático o parasimpático y la adición de agonistas adrenérgicos o colinérgicos no han producido secreción inequívoca del contenido de las células caliciformes³¹.

A pesar de la falta de evidencia de la regulación neurohormonal de la secreción, sí existen pruebas convincentes de ésta regulación a nivel de la proliferación de la células

caliciformes, durante la estimulación crónica colinérgica o adrenérgica³³. Los irritantes parecen ser más importantes que los mecanismos neurohormonales o reflejos para la regulación de la secreción de las células caliciformes.

En contraste con las células secretoras del epitelio superficial, se ha demostrado convincentemente la regulación neurohormonal de la secreción de macromoléculas de las glándulas submucosas³². La secreción glandular del fluido y moco se hallan bajo control neural parasimpático, adrenérgico y peptidérgico, en el que probablemente interviene el péptido intestinal vasoactivo²¹. Varios estímulos causan secreción glandular a través de vías reflejas vagales; la irritación mecánica y química de las vías aéreas (tabaco), la inflamación la hipoxia, etc....

Además del control neural, en la secreción de las glándulas intervienen mediadores de la inflamación locales como mastocitos y neutrófilos^{34,35}.

Dada la variedad de agentes capaces de estimular las glándulas submucosas y teniendo en cuenta que éstas contienen dos tipos de células diferentes, parece razonable pensar que existen dos mecanismos de regulación diferentes para cada tipo celular³⁴.

En dichas células³⁶ además de diferencias histoquímicas e inmunoquímicas, existen diferencias en el número y tipo de receptores presentes en las mismas²⁴. Estas diferencias en los receptores es paralela a la existente en la respuesta fisiológica; así tenemos que los agonistas alfa producen mayor estimulación de las células serosas, y los beta de las mucosas.

Además la estimulación alfaadrenérgica produce una secreción glandular con alto contenido de lisozima, viscosidad baja y contenido proteico bajo, mientras que la estimulación betaadrenérgica produce un fluido con poca lisozima, viscosidad alta y mayor contenido proteico. La estimulación colinérgica muscarínica parece²¹ actuar sobre los dos tipos de células, puesto que causa la degranulación en ambos y produce secreciones que podrían explicarse por la combinación de los productos de secreción las células mucosas y serosas.

3.1.3 - COMPOSICION BIOQUIMICA DE LA SECRECION BRONQUIAL

Las investigaciones de orden bioquímico²² realizadas en el curso de los últimos años han permitido identificar las sustancias que constituyen la secreción bronquial, precisando su origen y su significado fisiopatológico.

Para su estudio la secreción bronquial se considera fraccionable en tres fases diferentes; una fase *Espumosa*, la más superficial; una fase *Acuosa*, intermedia y una fase *Mucofibrilar*, más profunda e inferior (fig.6).

Esta diferenciación corresponde a la habitual separación espontánea de la secreción bronquial en un tubo de ensayo. Sin embargo esta separación neta muchas veces no se produce espontáneamente, por lo que es necesario inducirla mediante técnicas de centrifugación.

Fase Espumosa

Es la porción más superficial en la separación de la secreción bronquial y su nombre proviene de la formación de burbujas que se produce por el alto contenido proteico de las secreciones, también están presentes gran cantidad de sustancias fosfolipídicas, que provienen en parte de la mucosa bronquial y en parte del líquido que reviste la superficie alveolar (surfactante alveolar).

El análisis bioquímico²² de estos fosfolípidos ha puesto en evidencia la abundante cantidad de dipalmitoil-lecitina (o fosfatidil-colina)³⁷. Fosfolípido caracterizado por reducir la tensión superficial alveolar hasta niveles próximos a cero.

El estudio, pues de esta fase tiene especial interés para los fisiopatólogos que se dedican a la investigación de las características de las superficies tensioactivas del pulmón, alvéolos, y a las distintas alteraciones que en ellas se producen y que dan lugar a un variado cuadro de procesos broncopulmonares.

Fase acuosa

En esta fase, soluble, de las secreciones bronquiales están presentes preferentemente las sustancias proteicas difundidas desde el plasma o formadas localmente en la mucosa bronquial.

Las sustancias que provienen del plasma se difunden en las secreciones en relación con la vasodilatación o edema de la mucosa bronquial. Esta difusión está condicionada por el peso molecular de las sustancias concretas y por la etiología de la vasodilatación³⁵.

Habitualmente sólo algunas fracciones proteicas se identifican en las secreciones, pero su reconocimiento se facilita en la situaciones patológicas (Fig. 6). Asimismo mientras por lo general la difusión proteica plasmática afecta solamente a las sustancias de menor peso molecular, como la albúmina o algunas fracciones del grupo alfa globulínico, en

condiciones de flogosis extensa se encuentran también, en las secreciones, sustancias de mayor peso molecular tales como las gamma-globulinas o las beta-globulinas.

Aparte de estas proteínas plasmáticas en las secreciones existen enzimas y otras sustancias proteicas de secreción local. Se trata de enzimas de síntesis mucoproteica, como las transferasas, las glicosidasas o la calícreina y de sustancias como la lactoferrina y las IgA secretoras o fracción 11S de la IgA.

Dado que estas sustancias están presentes en la fase acuosa de las secreciones, pueden ser útiles para su identificación y valoración los métodos utilizados en el estudio de dichas sustancias en el suero tales como la Inmunodifusión Radial, la técnica de Lowry, etc...

Con el uso de estos métodos se han valorado las modificaciones producidas en el contenido proteico de las secreciones en los diferentes estados patológicos broncopulmonares, tales como los cuadros de E.P.O.C. y las Neoplasias pulmonares primarias o secundarias

Fase mucofibrilar

Esta tercera fase de las secreciones bronquiales comprende el moco propiamente dicho. Desde el punto de vista bioquímico esta constituido por glicoproteínas de alta peso molecular, alrededor de 500.000 Daltons y elevado contenido de carbohidratos, más del 40%.

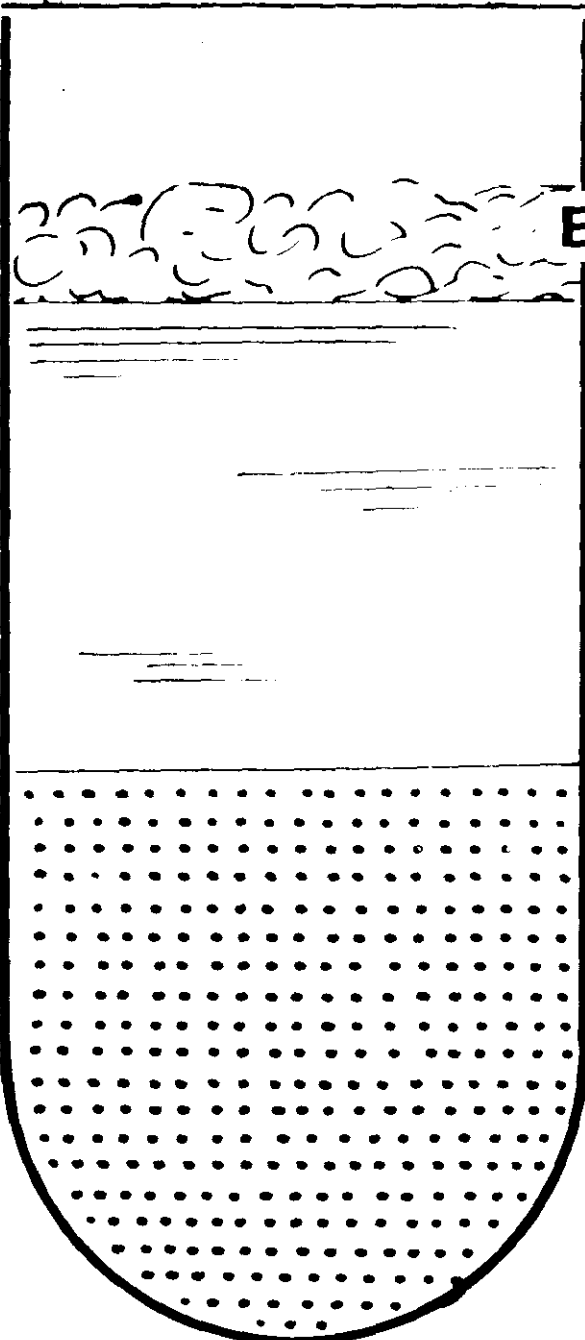
Las mucoproteínas bronquiales están formadas por un eje proteico, constituido por grandes cantidades de *serina*, *treonina*, *glicina*, *alanina* y *prolina*.

Lateralmente a este eje proteico central, están ensambladas varias unidades de polisacáridos compuestos de una o más moléculas de ácido siálico, de fucósido y de sulfato³⁸.

En la tabla I, se especifican los distintos componentes bioquímicos presentes en las secreciones bronquiales.

Por lo que se refiere a las moléculas de pequeño tamaño podemos decir que el sodio el potasio y el cloro se encuentran en concentraciones superiores a los niveles séricos, estas altas concentraciones en sodio y potasio son sin duda las responsables principales de la hipertonicidad de las secreciones bronquiales³⁹.

FIGURA 6.- Composición bioquímica del moco
bronquial (de Havez, modificado).

		PROTEINAS	GLUCIDOS	LIPIDOS
	ESPUMA	+	++	80 % PL
	FASE ACUOSA	60 . 70 %	20 . 30 %	+ AGL PL
	FASE MUCOFIBRILAR	30 . 40	50 . 60 %	+ + PL

El calcio, no soluble, puede estar formando complejos con las macromoléculas, en forma de fosfatos coloidales.

La histamina se encuentra en muy pequeñas cantidades 10-14 ug/gramo de peso en seco²², la exposición a agentes irritantes parece elevar dicha concentración de histamina.

Los aminoácidos ultrafiltrables presentes, posiblemente, como residuos libres o como péptidos pequeños y los carbohidratos en forma de residuos simples, oligosacáridos o glucopéptidos pequeños, se encuentran en concentraciones de 31.8 ± 16.6 y 6.3 ± 4.8 nm/l, respectivamente²². Los aminoácidos libres son esencialmente los mismos que se encuentran en el suero, no se conoce aún el origen de estos ni tampoco la distribución de los oligo y monosacáridos libres presentes en las secreciones bronquiales²².

En cuanto al DNA presente en las secreciones bronquiales éste es mínimo y se piensa que su origen puede radicar en la desintegración de las células en el árbol bronquial⁴⁰.

Numerosas proteínas identificadas en las secreciones bronquiales muestran una actividad enzimática sobre diversos sustratos. Como ya se dijo anteriormente, unas proceden del plasma y otras se producen localmente en la mucosa bronquial,

algunas presentan un notable interés en el campo de la patología pulmonar a causas de las modificaciones que experimentan en condiciones patológicas, pero al no ser motivo de este estudio sólo las mencionaremos de pasada y así tenemos:

-*Lactoferrina*: Descrita por primera vez en las secreciones bronquiales por Biserte et al⁴¹. Su concentración en la secreción bronquial es de 0.1-1 mg/ml con un peso molecular de 77.000 daltons. Posee muchas características comunes a la transferrina sérica. Su síntesis tiene lugar a nivel del epitelio glandular. En cuanto a su función biológica es probable que desempeñe una actividad bacteriostática, al privar a los germenés del hierro necesario para su metabolismo bacteriano. En los estados patológicos inflamatorios de la mucosa bronquial, el hierro es captado por esta enzima y trasladado hasta las reservas orgánicas de este metal.

-*Lisozima*: La primera descripción de la lisozima en las secreciones del árbol respiratorio se deben a Fleming que la detectó en sus propias secreciones nasales. En condiciones normales esta enzima procede de dos tipos de células, los macrofágos alveolares y los acinos glandulares. No se conocen sus concentraciones exactas en las secreciones bronquiales⁴².

TABLA I

Composición bioquímica de la secreción bronquial

AGUA: 95%
SOLUTOS 5%

I. PEQUEÑAS MOLECULAS

IONES:

Sodio: 211 mM/1000 gramos de material soluble en agua*
Potasio: 157 mM/1000 gramos de material soluble en agua
Cloro: 16 mM/1000 gramos de material soluble en agua
Calcio: 2 mM/1000 gramos de material soluble en agua

CARBOHIDRATOS:

N-acetil hexosaminas
Manosa
Fucosa
Galactosa
Fructosa
Acido siálico

II. ACIDOS NUCLEICOS

DNA: 0.017 mg/gr de secreción total

III. ENZIMAS

Lisozyrna
Calicreína
Lactico deshidrogenasa
Desoxirribonecleasas
Proteasas
Catepsina
Lactoferrina
Alfa-1-antitripsina
Ceruloplasmina

IV: OTRAS PROTEINAS GLICOPROTEINAS Y LIPIDOS

Fucomucinas
Sialomucinas
IgG
IgA secretoria
Albúmina
Surfactante

*** Sobrenadante tras centrifugación de la secreción bronquial**

En cuanto a su papel biológico parece intervenir junto con la IgA modificando la actividad y las propiedades físicas de las secreciones bronquiales⁴².

-.*Calicreína*: El edema de la mucosa, el broncoespasmo y la hipersecreción que representan síntomas comunes de los cuadros de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (E.P.O.C.), pueden encontrar entre otros argumentos una explicación en alteraciones a nivel de la mucosa de las vías aéreas, mediante la intervención de la calicreína bronquial ya que son péptidos muy relacionados con todos los procesos de flogosis a nivel del organismo⁴³.

-.*Láctico-deshidrogenasa (LDH)*: En los procesos broncopulmonares con alto grado de inflamación las isoenzimas 4 y 5 de la LDH, experimentan un incremento muy alto y por ello últimamente se estudia⁴⁴ el utilizar la determinación de estas isoenzimas como índice de valoración objetiva de la flogosis pulmonar.

-.*Alfa-1-antitripsina*: Es una globulina del grupo alfa, caracterizada por tener un peso molecular de 54.000 daltons y una velocidad de sedimentación de 3.5S. Posee actividad antiproteásica, dirigida hacia la inactivación de la *tripsina*, *quimiotripsina*, *calicreína*, *elastasa* y otras

proteasas de origen celular o bacteriano. La primera relación entre el déficit de esta enzima y los procesos broncopulmonares del tipo enfisematoso fueron establecidos en 1963 por Laurell y Erikson.

En las secreciones bronquiales la alfa-1-antitripsina puede aparecer en dos formas diferentes⁴⁵, una con capacidad de inhibición de las proteasas leucocitarias y otra inactiva en el orden funcional.

En el apartado IV de la tabla I únicamente nos detendremos en esbozar algunas de las características de las mucinas ya que lo referente a los lípidos ha sido mencionado al describir la fase espumosa (fig.7) de la secreción bronquial y en cuanto a las inmunoglobulinas serán mencionadas en partes posteriores de este trabajo. Solo de paso y en referencia los lípidos mencionar que parece que su origen está los neumocitos tipo II y las células de Clara^{22,24,37}.

Actualmente^{46,47} ,se distinguen tres tipos fundamentales de mucinas bronquiales:

-. *Sialomucinas*: Son lipoproteínas ricas en ácido siálico, poco abundantes en fucósido y casi privadas de grupos sulfúricos. Tienen carácter ácido, Ph: 2.5-3.5, y son sensibles

a la acción de las neuraminidasas, que liberan al menos el 50% del ácido siálico integrado en la molécula.

- . *Sulfomucinas*: Son mucinas fuertemente ácidas, Ph en torno a 2, ya que contiene de 4 a 5 radicales sulfúricos libres, sólo un 9% de fucósido y un 1.8% de ácido siálico, resistente a la acción de las neuraminidasas.

- . *Fucomucinas*: Contienen grupos CH_3 libres en proporción mayor del 10% y por lo tanto, tienen carácter neutro, Ph: 3.5-5.5.

Contrariamente a lo que ocurre con otras sustancias proteicas, en el caso de las mucoproteinas no puede ser descrita una composición química única y constante, ya que en su formación hay amplios límites de variabilidad, ligados al diferente papel que en cada molécula glicoproteica asumen los radicales COO , grupos carboxílicos del ácido siálico, SO_3 , radicales sulfúricos y CH_3 , grupos metílicos del fucósido³⁴.

Las propiedades biológicas más importantes y las actividades funcionales más significativas de las secreciones bronquiales dependen especialmente de la constitución bioquímica de las mucinas. Se sabe por ejemplo, que una característica fundamental de las mucoproteinas es su capacidad de ligar y

retener enormes cantidades de agua lo cual contribuye de forma esencial a la fluidificación de las secreciones bronquiales.

Igualmente su configuración estructural explica su resistencia a la acción lítica de las enzimas proteásicas presentes en las secreciones bronquiales.

Por otro lado la estructura peculiar de las cadenas carbohidratadas laterales les confiere la actividad de grupo sanguíneo que les permite inhibir la hemaglutinación producida por ciertos virus, especialmente el virus de la influenza.

Esta función puede atribuirse a los residuos de ácido siálico que se encuentran en posición terminal en las cadenas de oligosacáridos que ligan a los virus³⁷.

3.1.4 - PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA SECRECIÓN BRONQUIAL

Desde el punto de vista físico las secreciones bronquiales presentan las propiedades de una sustancia viscoelástica, con las características tanto de un sólido como de un fluido¹⁶.

Como un sólido las secreciones se deforman al aplicar una fuerza sobre ellas, acumulando energía (*elasticidad*). Como un

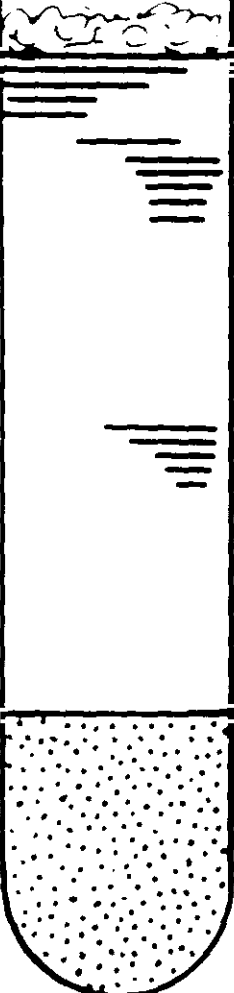
fluido se derraman bajo la acción de fuerzas aplicadas sobre ellas, perdiendo energía (*viscosidad*).

Newton observó que existen en realidad dos tipos de fluidos viscosos; aquellos en los que la viscosidad, es dependiente de la fuerza que se aplique sobre ellos y aquellos en los que la viscosidad no muestra una relación lineal con las fuerzas aplicadas sobre ellos, sino que se modifica independientemente de las mismas. Las secreciones bronquiales se comportan como un fluido no newtoniano.

Aparte de esta característica la secreción bronquial se comporta como un fluido *seudotixótro*po, es decir, posee la capacidad de fluidificarse si se le somete a agitaciones repetidas, volviendo a sus características más o menos parecidas a las anteriores si se le deja un cierto tiempo en reposo.

En estas propiedades físicas de las secreciones bronquiales influyen no solamente las sustancias producidas en la mucosa bronquial, sino también las proteínas plasmáticas, las células de descamación epitelial, las células hemáticas, los macrófagos alveolares, los componentes del sistema de surfactante del pulmón, etc...

FIGURA 7.- Representación esquemática de los principales constituyentes de las secreciones bronquiales (de Blasi y Olivieri, 1972).

		PROTEINAS	GLUCIDOS	LIPIDOS
	ESPUMA	+	++	80 %
		dipalmitoil - lectina y otros fosfolipidos		
	FASE ACUOSA	60-70 %	20-30 %	+
		<ul style="list-style-type: none"> - de procedencia plasmática: fracciones protéicas (albúmina, orosomucoide, alfa-1 antitripsina, alfa-2 macroglubulina, inmunoglobulinas A, G y M, etc.); enzimas (celulares, salivares, bacterianos); - de origen local: enzimas (transferasas, glicosidasas, calicreína); lactoferrina; IgA secretorias; «secretory component»; 		
	FASE MUCOFIBRILAR	30-40 %	50-60 %	++
		<ul style="list-style-type: none"> - mucinas bronquiales: mucoproteínas ácidas (sialomucinas y sulfomucinas) y neutras (fucoso mucinas); 		

Desde el punto de vista físico el moco bronquial es un fluido viscoso que no es ni perfectamente elástico, jamás recupera su forma original tras someterse a una presión, ni tampoco exclusivamente plástico, ya que la deformidad que se obtiene no es jamás permanente como en los cuerpos plásticos; por ello puede decirse que las secreciones bronquiales son un fluido parcialmente viscoelástico y pseudoplástico⁴⁸.

Las funciones de la secreción bronquial están en parte condicionadas por su composición bioquímica y por sus características físicas anteriormente vistas. (Tabla II)

En resumen, la principal función de la secreción bronquial es la de mantener las condiciones idóneas del ambiente necesario para el intercambio gaseoso con el exterior, es decir, para la respiración³¹.

TABLA II

Funciones de la secreción bronquial

I. INESPECIFICAS (Defensa mecánica y biológica)

Humidificación del aire
Filtración y dilución
Eliminación de las partículas inertes
Depuración biológica

II. ESPECIFICAS (Defensa inmunitaria/Inmunología de la mucosa)

Inmunidad por anticuerpos
Inmunidad por células

- . *Humidificación del aire:* Es la más simple y conocida de las funciones de la secreción bronquial. Numerosas investigaciones experimentales^{31,49} demuestran que, en ausencia de secreción bronquial, las vías aéreas se alteran profundamente, además la inhalación de aire seco influye sobre la producción de secreción bronquial, así, cuando en el árbol bronquial se introduce aire seco, se produce una deshidratación progresiva hasta transformarse la secreción en una verdadera costra con incluso parálisis de los cilios.

En resumen la humidificación del aire es necesaria e indispensable para el mantenimiento de la integridad anatómica de la mucosa bronquial y de la actividad vibrátil de los cilios.

- . *Filtración y dilución:* La mucosa bronquial es una de las vías más importantes para la filtración de sustancias tanto irritantes como medicamentosas, naloxona, adrenalina, etc...

La mayor parte de los estudios experimentales⁵⁰ sobre el tema han sido realizados con gases del tipo SO_3 y O_3 , ambos muy irritantes para la mucosa bronquial, las primeras alteraciones se producen en relación a la perfusión hemática, a la cantidad de secreción producida, a su calidad y a la velocidad de

arrastre del moco en las vías aéreas. En la mucosa puede producirse edema, necrosis y descamación epitelial.

Como medida defensiva el gas inhalado es diluido en la superficie mucosa, para posteriormente cuando su presión parcial en el aire sea inferior a la del ambiente fluido ser eliminado por la espiración, una pequeña parte del gas puede ser absorbido para más tarde ser eliminado por los fenómenos de oxigenación de la sangre⁵⁰.

- *Eliminación de partículas inertes:* Un individuo sano inhala unos 10 m³ de aire al día⁵⁰, que contienen en suspensión partículas diversas en cantidad y calidad variable, dependiendo del ambiente en el que el sujeto respira.

La eliminación de éstas partículas se produce de manera y cronología diferentes en los distintos tramos del aparato respiratorio.

A nivel del tracto pulmonar, es decir, en aquella zona que comienza más allá de los bronquiolos terminales la eliminación se realiza mediante los fenómenos de fagocitosis llevados a cabo por los macrófagos. La migración de los macrófagos puede acontecer directamente con la llegada de los mismos hasta el

moco bronquial o a través de las vías de drenaje linfático del pulmón.

Por lo que se refiere al tracto traqueo-bronquial la depuración de las partículas inertes se realiza por el mecanismo de "*Clearance*" mucociliar en el que intervienen tanto las propiedades físicas como la composición bioquímica de la secreción bronquial.

Se ha observado⁵¹ que en la mayor parte de las alteraciones funcionales que caracterizan a la broncopatía crónica obstructiva se dan alteraciones de la depuración broncopulmonar, en el sentido de que asiste habitualmente a una sedimentación aumentada en el *tracto traqueobronquial* de las partículas inhaladas, con la consiguiente reducción de la depuración de éstas a nivel de la superficie alveolar.

Este fenómeno es la expresión evidente de las profundas modificaciones que se producen en la distribución del aire inspirado y de la alterada llegada del mismo a la superficie alveolar⁵².

-. *Depuración biológica*: Como ya vimos anteriormente, en la secreción bronquial se encuentran numerosas sustancias, lactoferrina, lisozima, etc..., cuya misión fundamental es

neutralizar las sustancias de origen exógeno como bacterias, virus, hongos etc...

Por lo general el mecanismo de acción de estas sustancias es inespecífico, es decir, se vuelven de modo indiscriminado contra todas las sustancias capaces de contaminar las vías aéreas.

- *Funciones específicas:* Están representadas por la defensa inmunitaria tanto celular como humoral, que serán estudiadas en detalle en otra parte de este trabajo, por lo cual no consideramos oportuno detenernos más en este punto a fin de evitar repeticiones innecesarias. Únicamente mencionar que a nivel humoral aparte de la IgA se han detectado pequeñas cantidades de IgG, IgM e IgE. De ellas la que se encuentra en mayor concentración a nivel pulmonar es la IgG, localizada preferentemente a nivel alveolar, desarrollando funciones de aglutinación y opsonización, pudiendo activar el complemento y neutralizar exotoxinas bacterianas y viricas⁵³.

Podemos decir, en resumen, que la protección de las vías aéreas esta confiada a las secreciones bronquiales por mecanismos específicos e inespecíficos los cuales presentan interacciones entre ellos y al mismo tiempo conllevan ventajas y desventajas; así por ejemplo, los mecanismos inespecíficos

suelen ser más rápidos de actuación que los específicos, pero como su propio nombre indica son menos selectivos y por tanto menos eficaces, aunque no por ello dejan de ser imprescindibles para el buen funcionamiento de los específicos.

Esta sincronización entre unos y otros únicamente es posible en un *microambiente* como el representado por las vías aéreas que por sus características especiales permite la más completa esterilidad y una adecuada capacidad de actuación de los mecanismos indicados para evitar la colonización de las más diversas sustancias inhaladas.

3.2. - INMUNOLOGIA DE LAS MUCOSAS

Las superficies mucosas de cualquier parte del organismo, mucosa traqueo-bronquial, urogenital, gastrointestinal etc..., constituyen una superficie muy extensa, a través de las cuales pueden entrar microorganismos, toxinas y cualquier otro tipo de antígeno para evitar esto, dichas mucosas poseen una serie de componentes que actúan como defensa a fin de evitar su agresión.

Así, como principales elementos en la defensa de estas mucosas tenemos: a) *el mecánico*, constituido por los sistemas de drenaje, en los que participan el epitelio ciliado, el moco, distintos tipos de reflejos como el tusígeno a nivel del aparato respiratorio, y diversas estructuras anatómicas como por ejemplo (trompa de Eustaquio, cornetes, orificios de drenaje de los senos paranasales, glotís, etc...) del tracto respiratorio; b) *el componente humoral*, integrado por la presencia en las secreciones de diversas enzimas como, la lisozima, la lactoferrina, inmunoglobulinas y complemento, que destruyen y/o evitan la adherencia de los antígenos a su superficie; c) *el celular*, en el que participan los macrófagos y los leucocitos, que procedentes de la sangre emigran hacia las mucosas.

De los componentes antes mencionados, seguramente uno de los más importantes sea *el humoral* representado mayoritariamente por el elemento inmunológico, que corre a cargo de las inmunoglobulinas secretadas localmente (inmunoglobulinas secretorias), de las cuales la más importante es la IgA¹ .

En los últimos años se han empezado a conocer las características y el lugar de origen de estas inmunoglobulinas, las emigraciones celulares necesarias para que surjan las células plasmáticas que las producen y también, su importancia en la patología humana.

3.2.1. - INMUNOGLOBULINAS SECRETORIAS

Como ya mencionamos anteriormente, en las secreciones pueden encontrarse todos los tipos de inmunoglobulinas, pero sus proporciones respectivas son distintas a las de la sangre, así tenemos que por ejemplo, la IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero [IgG]= 8-16 mg/l, mientras que en las mucosas es la IgA la que predomina con creces¹ y algunas de ellas (concretamente la IgA), se encuentran bajo forma física diferente a como se encuentran en el suero.

Las células plasmáticas localizadas bajo el epitelio mucoso, son las productoras de estas inmunoglobulinas y proceden de los linfocitos B precursores existente en las formaciones linfoides próximas.

El transporte de las inmunoglobulinas, desde la células plasmáticas, hasta la luz bronquial se hace de forma diferente según se trate de inmunoglobulinas mono o poliméricas².

En el primer caso las inmunoglobulinas monoméricas (IgE, IgG e IgD) pasan a la superficie de la mucosa de forma inespecífica, sin intervenir para nada ningún tipo de componente secretor. Una vez que atraviesan la membrana basal, son captadas por pinocitosis por las células epiteliales, pero al no estar protegidas por ningún componente secretor son degradadas por los sistemas enzimáticos, esto explica la baja concentración a la que se encuentran en las secreciones⁴⁹.

En el segundo caso, las inmunoglobulinas poliméricas (IgA e IgM), una vez unidas a la *cadena J* (véase más adelante) dentro de la célula plasmática, son segregadas atravesando la membrana basal. Al ponerse en contacto con las porciones basal y laterales de la membrana de la célula epitelial, se unen a unas moléculas glicoproteicas (véase más adelante), denominadas *componente secretor*.

Al unirse al *componente secretor* son interiorizadas en la célula por pinocitosis y transportadas hasta el polo luminal desde donde son vertidas a la superficie mucosa. El *componente secretor* es imprescindible para este fenómeno, protegiendo además a las inmunoglobulinas contra la acción proteolítica de las enzimas segregadas por las mucosas.

Estructura general de las inmunoglobulinas

Las Inmunoglobulinas (Ig) son un grupo de glucoproteínas, compuestas por un 82-96% de polipéptidos y un 4-18% de carbohidratos, presentes en el suero y líquidos orgánicos de todos los mamíferos. Son producidas por las células plasmáticas que constituyen el estadio diferenciativo terminal de los Linfocitos B⁵⁴.

En 1959 Rodney Porter y Edelman, propusieron para las moléculas inmunoglobulínicas un modelo básico en cuatro cadenas , que se basa en dos tipos distintos de cadenas polipeptídicas:

-.CADENAS H (Heavy): Formada por una secuencia de 450 aminoácidos, con un P.M. total de entre 55.000 a 77.000 daltons, siendo estructuralmente distinta para cada clase de Ig.

-CADENAS L (Light): Formada por una secuencia de 212 aminoácidos, con un P.M. total de 25.000 daltons, siendo estructuralmente común a todas las clases de Ig.

Las cadenas polipeptídicas no existen tridimensionalmente como secuencias lineales de aminoácidos, sino que, están plegadas por enlaces disulfuro en regiones globulares denominadas *Dominios*⁵⁵. Los dominios de las cadenas H se designan V_H y C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}, y los de las cadenas L se designan como V_L y C_L.

Las cadenas están unidas entre sí, por enlaces covalentes de puentes disulfuro y no covalentes entre los residuos de cisteína de tal manera que, cada cadena L está unida a una H y las dos H están unidas entre sí.

Esta disposición en las uniones es esencial para la estructura tridimensional de las inmunoglobulinas.

Los trabajos de Hilschmann y Craig⁵⁵, mediante la secuenciación de las cadenas ligeras, demostraron que existían una serie de aminoácidos que variaban de proteína a proteína, que incluían aproximadamente los residuos del 1 al 108, dentro del mismo tipo de cadena ligera y que por el contrario, los residuos del 109 al 215 eran constantes para las mismas

proteínas, por lo que a estas regiones se las denominó respectivamente V_L o región variable y C_L o región constante, esto también se observó en las cadenas pesadas.

Según las diferencias antigénicas de las cadenas H ó pesadas se distinguen cinco tipos de cadenas H: *a*, *γ*, *u*, *d* y *e*, que dan lugar a las distintas clases de inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD, e IgE respectivamente. Como consecuencia de distintas variaciones dentro de la secuencia de una misma cadena H se pueden distinguir algunas subclases de Ig.

Así tenemos por ejemplo, que dentro de las cadenas H de la IgA e IgG se han distinguido diversos *alotipos*, es decir formas polimórficas (alélicas) de las cadenas H, que se transmiten por un patrón de herencia mendeliana, estos determinantes antigénicos que caracterizan a los distintos *alotipos* se suelen localizar en la región constante, en este caso que nos ocupa, de las cadenas H.

Estos *alotipos*, el *Gm* en la fracción constante de la cadena *γ* de la IgG y el *alotipo Am*, presente en la fracción constante de la cadena *a* de la IgA, y más concretamente en los dominios C_H2 y C_H3 están asociados con las diferentes subclases existentes de dichas inmunoglobulinas.

Así, en la IgG existen cuatro subtipos de cadena pesada γ , (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4) dando lugar a los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, subclases de la molécula de inmunoglobulina G.

Mientras, que gracias al alotipo A_m , podemos distinguir dos subclases de cadenas α de la IgA dando lugar a los subtipos IgA1 e IgA2 como luego veremos.

Por lo que se refiere a las cadenas L o ligeras, únicamente existen dos tipos $Kappa$ y $Lambda$, que son comunes a todas las clases de Ig, de tal manera que en una molécula las cadenas L son las dos del mismo tipo $Kappa$ o $Lambda$.

En las cadenas L del ser humano, también se han detectados variaciones alotípicas, correspondientes a la presencia de ciertos péptidos que funcionan como *Epítopes* o determinantes antigénicos.

Dentro de las cadenas L del tipo K se han detectado tres alotipos K_m el K_m [1], el K_m [1,2] y el K_m [3], relacionados con variaciones de aminoácidos en las posiciones 153 y 191 [K_m [1]: Val(153),Leu(191); K_m [1,2]: Ala(153),Leu(191) y K_m [3]: Ala(153), Val(191), lo que ha permitido distinguir tres subtipos de cadenas ligeras K, cadena K1, K2 y K3.

El tratamiento de la molécula de Ig con proteinasa vegetal como la papaína⁵⁶ la escinde en la región denominada *bisagra* (zona de las cadenas H en la región C, entre el primero y segundo dominio de la región C (C_{H1} y C_{H2}) dando lugar a tres fragmentos dotados de diversas propiedades:

- . Fab (Fragment antibody binding): son dos fragmentos idénticos formados por una cadena L, más la mitad de una cadena H y la región de la bisagra, a través del cual se une la molécula al antígeno y en el que se encuentran los determinantes antigénicos comunes a todas las inmunoglobulinas.

- . Fc (Fragment Crystalable): compuesta por la mitad de las cadenas H, carece de actividad inmunoglobulínica, aunque sí posee actividades efectoras tales como la fijación del complemento, la unión a los macrófagos y la transmisión placentaria⁵⁶ y es el que contiene la mayor parte de los hidratos de carbono.

Ambos fragmentos tienen un coeficiente de sedimentación de 3.5 S y un P.M. molecular aproximado de 55.000 Daltons.

Por lo que hace referencia a los hidratos de carbono de la molécula de las inmunoglobulina, su contenido varía para las diferentes clases de Ig, oscilando sus valores entre el 2-3%

para la IgG, 7-11% para la IgA, 12% para la IgM, 9-14% para la IgD y 12% para la IgE. Su fijación a la parte proteica suele tener lugar por N-glucosilación por unión de un residuo de *N*-acetilglucosamina al amido grupo de una *asparagina*.

Los principales azúcares identificados en los polisacáridos existentes en las diferentes inmunoglobulinas han sido *N*-acetilglucosamina, *N*-acetil-*D*-galactosamina, ácido *N*-acetil-neuramínico, *L*-fucosa, *D*-galactosa y *D*-manosa.

Las unidades de hidratos de carbono suelen localizarse en el fragmento Fc de las cadenas H, y en algunos casos⁵⁷ como la IgM e IgE en el fragmento Fab.

Todavía no esta clara su función dentro de las moléculas de inmunoglobulinas, pero parece que juegan un papel protector de la molécula al clivaje por enzimas proteolíticas, dificultando la exposición de los sitios de ataque⁵⁷.

Existen datos experimentales⁵⁸ que hacen suponer que estos oligosacáridos participarían activamente en la secreción de las moléculas de anticuerpos (véase más adelante).

3.2.2 - INMUNOGLOBULINA A (IgA)

La inmunoglobulina A [IgA] constituye la principal clase de inmunoglobulina presente en las secreciones tal y como demostró Tomasi y Hanson¹. La IgA, que se va a transformar en IgA secretoria, es sintetizada localmente por células plasmáticas que se encuentran en determinadas glándulas (salival, lacrimal y mamaria) y en las mucosas que tienen contacto con el medio externo (aunque no está excluida la proveniente de los vasos sanguíneos).

La IgA secretoria bajo la forma de dímero (IgA₂) se une al componente secretorio (véase más adelante) en la membrana de las células epiteliales que sintetizan este polipéptido, y el complejo IgA₂-S formado es transportado a través de las células epiteliales en vesículas y puesto en libertad en la superficie de la mucosa.

La existencia de una molécula especializada de IgA, a nivel mucoso, explica la resistencia inmunológica específica a infecciones de las mucosas que existen en ausencia del anticuerpo sérico de la clase IgA demostrable⁴⁸.

3.2.2.1.- ESTRUCTURA DE LA IGA

El mayor avance en el conocimiento de la estructura y propiedades de la IgA se ha conseguido mediante su estudio en los mielomas que contienen IgA⁴.

La IgA sérica tiene la estructura elemental de las inmunoglobulinas es decir, dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro.

Una característica de la IgA muy particular, es su marcada heterogeneidad que se debe a un conjunto de componentes con constantes de sedimentación que van de 7 S a 13 S, formados por polimerización y disociables por *mercaptoetanol* y *urea* en medio ácido⁵⁷, esta heterogeneidad estructural de la IgA justifica las variaciones de P.M. de la misma que oscila desde 160.000 daltons (IgA 7S) hasta 385.000 (IgA 11S), 480.000 (IgA 13S), 640.000 (IgA 17S) y 800.000 (IgA 18S).

Su contenido en hidratos de carbono ocupa un lugar intermedio entre la IgG y la IgM, siendo los valores algo superiores al 7% con una relación hexoxamina/hexosa de 0.8. La IgA al igual que la IgM no atraviesa la placenta⁶⁰.

La degradación enzimática con papaína produce subunidades 3.5 S constituidas por péptidos Fab y pequeños péptidos resultantes de la degradación enzimática del fragmento Fc.

Por reducción y alquilación se obtienen las cadenas polipeptídicas L y H, siendo las cadenas L similares a las de las otras inmunoglobulinas. Las cadenas H encambio, tienen características propias, son del tipo α , existiendo dos subclases la α_1 y la α_2 ; los 472 aminoácidos de la cadena α están dispuestos en cuatro dominios (V_H , Ca1, Ca2, Ca3).

Una característica compartida con la IgM⁶⁰ es la presencia de un octapéptido C terminal en el penúltimo residuo de cisteína, por el que se une covalentemente a la molécula J.

El tratamiento de la IgA con una proteasa obtenida del *Streptococcus sanguis*⁶¹ cliva a la inmunoglobulina en la zona de la brisagra, por encima de los puentes disulfuro (intercadenas H-H), dando origen a los péptidos Fab $_a$ y Fc $_a$, similar éste último a los péptidos Fc de las otras inmunoglobulinas.

La separación de ambos péptidos se consigue por filtración a través de Bio-gel P-200. El Fc $_a$ obtenido por este procedimiento puede aislarse como monómero, con una constante de

sedimentación de 3.0 S y P.M. 41.500 Daltons, o como dímero con un coeficiente de sedimentación de 5.3 S. Por reducción con ditiotreitól, el dímero se transforma en monómero⁶¹.

La mencionada enzima es efectiva en el clivado de ambos tipos de IgA, tanto sérica como secretoria, permitiendo en ambos casos obtener el fragmento Fc_a , aunque para algunos autores⁶² sólo es efectiva para el clivaje de la IgA1 y no de la IgA2 (vease más adelante).

Se conocen⁶¹ dos subclases de IgA, como consecuencia de la variación antes vista en las cadenas H, la IgA1 y la IgA2 (fig.8), que difieren antigénicamente y por su contenido en *galactosamina*, aminoazúcar que sólo esta presente en la IgA1.

Los pesos moleculares de las cadenas a_1 y a_2 son de 58.000 Daltons y 52.000 daltons respectivamente.

Por lo que se refiere a la IgA2 se han descrito dos formas alotípicas, referidas a la variación genética dentro de la especie humana, cada una de estas formas alotípicas corresponden a la presencia de ciertos péptidos que funcionan como determinantes antigénicos.

Así tenemos, la IgA2 A2m [2] en la que se ha observado una ausencia de puentes disulfuro entre las cadenas L y H, lo que hace presumir que la integridad de la molécula se debe a uniones no covalentes y la IgA2 A2m [1] en la que sí existen puentes disulfuro entre ambas cadenas polipeptídicas, así mismo la otra diferencia básica entre ambas formas alotípicas radica en los aminoácidos situados en los residuos 411-428-458 y 467 ocupados en el caso de la IgA2 A2m [2] por Phe-Asp-Val-Val respectivamente y en el caso de la IgA2 A2m [1] ocupados por Thr-Glu-Ile-Ala, en ambos casos su estructura normal es IgA1 (α_1 Kappa o Lambda) y IgA2 (α_2 Kappa o Lambda)

En el ser humano la IgA sérica habitualmente se encuentra en forma de monómeros¹ siendo más frecuente la subclase IgA1, (80-90%) estando el resto en forma del subtipo IgA2 (10-12%) aunque una pequeña parte (10-15%) puede encontrarse circulando en forma de dímeros. (fig.9)

La IgA de las secreciones orgánicas (S-IgA) es predominantemente del tipo IgA2 (80-90%) con un coeficiente de sedimentación de 11 S, encontrándose asociada a un componente antigénicamente distinto de las cadenas L y H, llamado *componente secretorio* (CS).

El P.M. de la IgA secretoria es de 385.000 Daltons y su estructura esta formada por dos unidades monoméricas de IgA2 (7 S) y el *componente secretorio* de P.M. 70.000 daltons, que parece estar unido solamente a uno de los monómeros de IgA.

La unión entre los monómeros de IgA es por puentes disulfuro en los que interviene la *proteína J* (vease más adelante). La unión con el *componente secretorio* es por uniones covalentes de puentes disulfuro y no covalentes.

Si bien las IgA secretoras representan el tipo más abundante de las inmunoglobulinas en las secreciones externas¹, existen sin embargo pequeñas cantidades de IgA monomérica² (IgA 7 S) [0-10%] y de IgA polimérica (IgA 10-13 S) [10-20%]. (fig.9)

La vida media de la IgA secretoria se estima en unos seis días y la producción diaria de IgA total (sérica y secretora) esta calculada en unos 66 mg/Kg de peso, de los cuales aproximadamente 2/3 provienen del TLRM⁶⁴.

Esta relativagran cantidad de IgA sintetizada en el TLRM puede ser debida a la constante contaminación, comensal o patológica, a que estan sometidas las superficies mucosas de nuestro organismo⁶⁵.

FIGURA 8.- Características de la IgA1 e IgA2 humanas del suero.

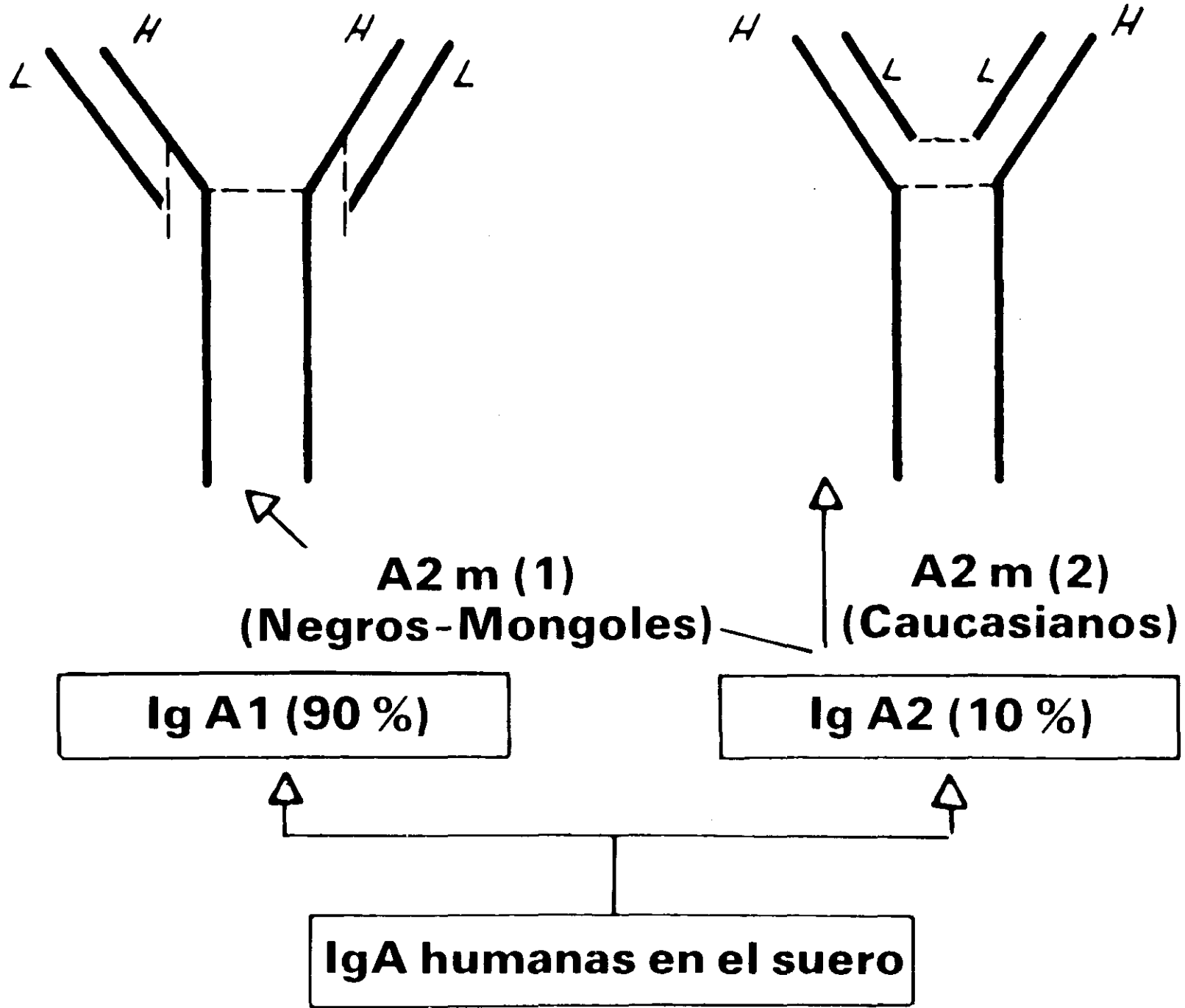


FIGURA 9.- Características de la IgA en el suero y en las secreciones bronquiales.

	<i>Forma</i>		<i>Subclase</i>	<i>J</i>	<i>S. C.</i>
Suero	monómero (7S)	85-90 %	IgA ₁ : 88 %	presente en los polímeros	normalmente
	polímeros (10S-13S)	10-15 %	IgA ₂ : 12 %		ausente
Secreciones bronquiales	dímeros (11S)	80-90 %	IgA ₁ < IgA ₂	presente en los dímeros	presente en forma libre o combinada
	polímeros (10S-13S)	10-20 %			
	monómero (7S)	0-10 %			

Componente secretor de la IgA (CS)

El *componente secretor* también denominado *cadena T* o *pieza secretoria*, fue aislado por Tomasi¹ en 1965, los estudios posteriores de Havez (1967)⁶³, permitieron demostrar que se trataba de una glucoproteína de un P.M. aproximado de 70.000 Daltons, expresada como una proteína integral de membrana en la membrana basolateral de las células epiteliales mucosas.

Su contenido en hidratos de carbono es muy alto representando un 16% de la molécula⁶³.

Como más adelante veremos parece ser que la función principal de esta proteína, es el transporte de la IgA secretada por los inmunocitos de la lámina propia de las mucosas, a través de las células epiteliales hacia el polo apical para su posterior secreción a la superficie mucosa.

Así mismo aparte de actuar como transportador de la IgA, el *componente secretorio* (CS) aumenta la resistencia de la inmunoglobulina ante la proteólisis inducida por las enzimas presentes en las secreciones mucosas, esto explicaría tal y como más atrás se indicó la prevalencia casi absoluta de la IgA, sobre el resto de las demás inmunoglobulinas en las superficies mucosas⁶⁴.

La presencia de este *componente secretor* (CS) confiere por otra parte, propiedades antigénicas adicionales a la IgA secretoria, lo cual permite la utilización de anticuerpos específicos frente al *componente secretor*, para la diferenciación entre la IgA sérica y la IgA secretoria ⁶⁴.

La unión del *componente secretor* a la IgA se realiza mediante los residuos de cisteína presentes en los dominios Ca₂ de dicha inmunoglobulina, a través de enlaces covalentes de puentes disulfuro y no covalentes y únicamente con sólo una de las unidades monoméricas de IgA (fig.10).

Los estudios realizados de recombinación entre el *componente secretor* y varias especies de inmunoglobulinas, parecen demostrar que la molécula de IgA se asocia al (CS) solo cuando la primera contenga la llamada *cadena J* (véase más adelante), por tanto la unión del *componente secretor* a la IgA parece tratarse de un fenómeno de reconocimiento del primero, sobre aquellas segundas que contengan en su molécula la *cadena J* ⁶³.

Cadena J (Joining=unión)

Descrita en 1970 por Halper y Kosland⁶³, es una glucoproteína que se encuentra formando parte de los polímeros de IgA e IgM, con un alto contenido en ácidos aspártico y glutámico, como consecuencia de esta elevada naturaleza ácida posee una movilidad electroforética muy rápida en geles alcalinos; el equilibrio de centrifugación en clorohidrato de guanidina 5.0 mol indica que la *cadena J* tiene un P.M. de aproximadamente 15.000. Los estudios fisicoquímicos indican que es una molécula muy alargada con una relación axil de aproximadamente 18 ⁶⁶.

Es un producto de síntesis de las células plasmáticas formado por 137 aminoácidos, representa el 3% del peso de la IgA secretoria y el 1% del peso de la IgM ⁶⁷.

Es interesante destacar, que en los diferentes polímeros de IgA e IgM sólo se ha detectado una *cadena J* por polímero, a los cuales se encuentra unida mediante un octapéptido C-terminal adicional, unido al penúltimo residuo de cisteína de las cadenas pesadas *a* y *u* respectivamente ⁶⁷.

En cuanto a la función de la *cadena J* no está bien determinada, pero parece que desempeña un papel muy importante

en el proceso de polimerización de las inmunoglobulinas antes mencionadas. Hay formación de uniones covalentes de una *cadena J* a dos unidades monoméricas vecinas, independientemente de los monómeros que contenga el polímero, el hallazgo de péptidos *a-J-a* es un argumento de valor en este sentido⁶⁸ .

En contra de estas teorías que asignan como función única de la *cadena J* la polimerización de las inmunoglobulinas, se encuentran estudios⁶⁹ en los que se ha demostrado la presencia de *cadenas J* en células plasmáticas productoras de IgG monomérica.

Apoyando estos estudios que restan importancia a las *cadenas J* en la polimerización de las inmunoglobulinas, tenemos los hallazgos encontrados en ciertos vertebrados como el tiburón "nodriza" y el pez "hoja" en los que las inmunoglobulinas poliméricas carecen de dichas *cadenas*⁷⁰ .

No obstante, aún no teniendo una idea clara de como las *cadenas J* contribuyen a la polimerización de las inmunoglobulinas lo que si está claro, es que su presencia facilita la unión de las unidades monoméricas de IgA e IgM ⁶⁶.

3.2.2.2.- SINTESIS DE LA IGA EN LAS MUCOSAS

En los estudios realizados con radioisótopos e inmunofluorescencia⁷¹ se ha podido demostrar que la IgA presente en las secreciones mucosas tiene un doble origen.

Por un lado existe un pequeño porcentaje (1-2%) que procede de las células plasmáticas sanguíneas, la cual se extravasa desde los vasos a la superficie mucosa, por un fenómeno de difusión pasiva potenciado en los casos de vasodilatación y de edema localmente relacionados con las mucosas.

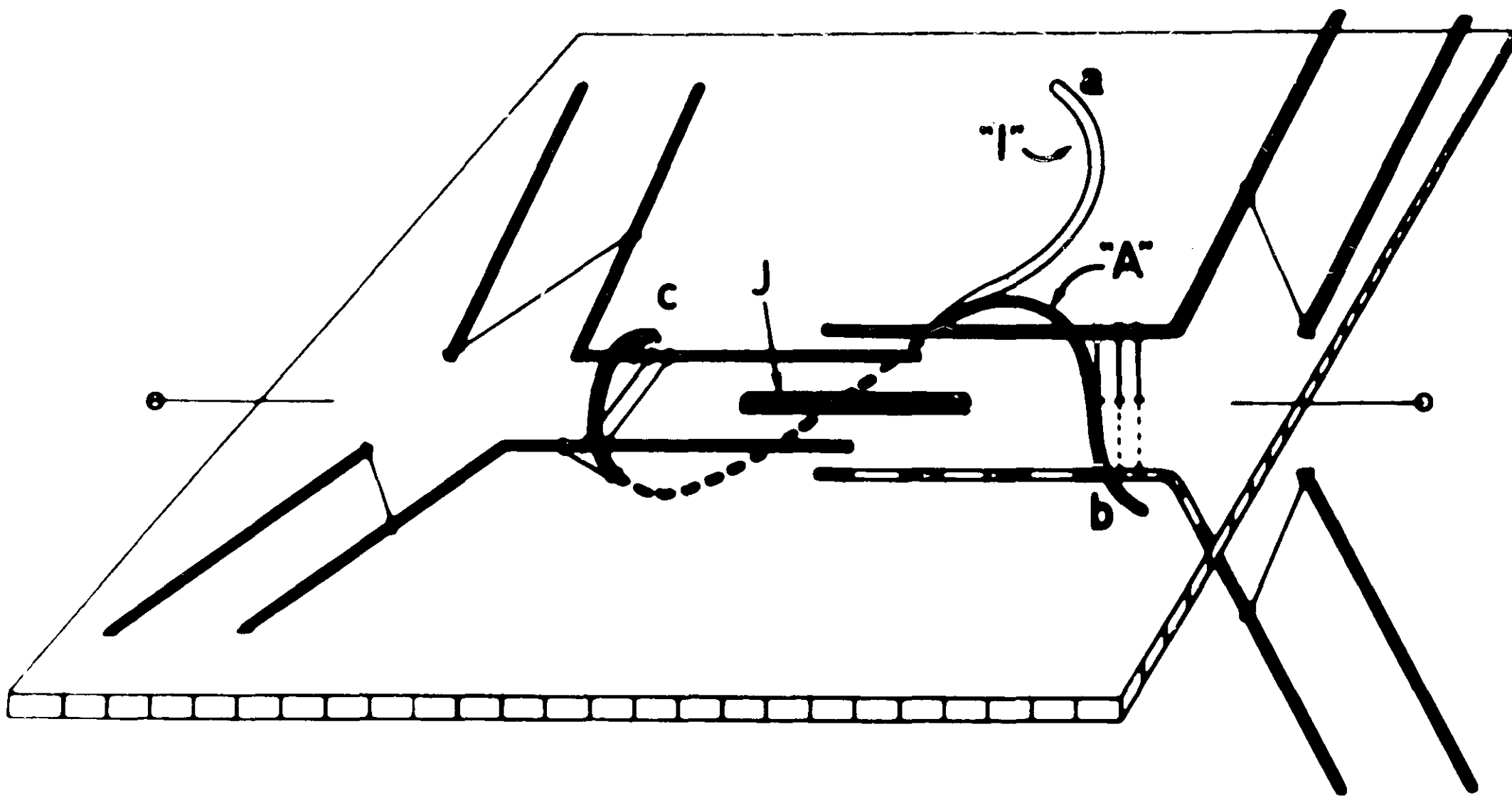
Esta IgA es de tipo monomérico (IgA 7S) y está constituida mayoritariamente por el subtipo IgA1.

Pero, por otro lado la producción más importante de IgA se realiza a nivel de los propios tejidos mucosas, por un mecanismo de síntesis local^{1,14,72,73,74,75,76,77}.

Sistema TLRM

Esta síntesis local se realiza a través de las células plasmáticas localizadas en la lámina propia de las mucosas.

FIGURA 10.- Estructura de las IgA secretorias (de Heremans, 1975).



Los precursores de estas células plasmáticas son los Linfocitos B que provenientes de la médula osea y se localizan a nivel del *tejido linfoide relacionado con las mucosas* (TLRM), en inglés (MALT) el cual ha sido especialmente estudiado a nivel del intestino y de la mucosa bronquial, en lo que se ha dado por denominar *tejido linfoide relacionado con el intestino* (TLRI), en inglés (GALT), o en el *tejido linfoide relacionado con los bronquios* (TLRB), en inglés (BALT) respectivamente^{78,79,80}.

El *tejido linfoide relacionado con el intestino* (TLRI ó GALT) esta formado por dos tipos principales de agregados linfoides. El primero se conoce como *las placas de Peyer*, constituidas por agregados linfoides caracterizados estructuralmente por un folículo central, dependiente de células B y regiones T dependientes vecinas al folículo. Los linfocitos B de estas placas son muy heterogéneos ya que incluyen células B que expresan IgM, IgA, IgE y IgG y varias células T reguladoras (linfocitos T cooperador y/o T supresor) y efectoras (linfocitos T citotóxico) (vease más adelante).

Las placas están cubiertas por un linfoepitelio especializado, formado por las llamadas *células M*,⁸¹ procedentes de las criptas de dichas placas, son células delgadas, no columnares, con muy pocos microvillis, sin

lisosomas, con un glicocálix poco desarrollado y en cambio, gran cantidad de vacuolas citoplasmáticas. Parece que su función primordial es la presentación del antígeno³ para lo cual se transforman en células Ia (células CPH clase II).

El segundo tipo de agregados linfoides asociados a la mucosa intestinal son folículos linfoides aislados con sus respectivas zonas T y B dependientes, localizados en el apéndice, íleon, ganglios mesentéricos etc...

También existen células linfoides diseminadas por toda la lámina propia de la mucosa intestinal y entre las células epiteliales de absorción, el denominado *compartimento intraepitelial*.

Este *compartimento intraepitelial* está constituido, de forma casi exclusiva por células mononucleares, careciendo de macrófagos pero contiene algunas células cebadas y sus precursores. De las células linfoides presentes en este *compartimento intraepitelial* únicamente se encuentran linfocitos T, expresando la mayoría de ellos algún antígeno relacionado con la célula T citotóxica/supresora.

En la lámina propia del intestino delgado del hombre el 85% de las células B serán precursoras de IgA, el 5% de IgG y un

10% de IgM e IgE, mientras que la mayoría del grupo de células T son del tipo *T Helper o colaborador*⁸². (vease más adelante)

Por último, dentro del TLRI se incluyen los linfocitos y macrófagos presentes en la misma luz intestinal, cuya función esta todavía poco aclarada⁸³.

El tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB ó BALT) consiste en agregados linfoides muy similares, en morfología, a los observados en el intestino. Igualmente poseen un epitelio especializado, *las células M* con la misma propensión para actuar como sitios específicos para la presentación del antígeno.

El resto de los tejidos mucosos del cuerpo, localizados en el oído medio, en parte de las vías urogenitales, la glándula mamaria, la conjuntiva y las glándulas salivales, han sido poco estudiados en cuanto a sus TLRM, pero si se han descrito folículos linfoides en algunos de estos tejidos⁸⁴.

El primer paso seguido por el *tejido linfoide relacionado con las mucosas (TLRM)*, para la producción de IgA secretora, debe ser la estimulación de éste por los distintos antígenos.

La existencia de fenómenos de captación antigénica a nivel mucoso, esta más que demostrada por todas las técnicas de inmunización oral y bronquial^{85,86,87}.

El epitelio mucoso⁸⁸ no actúa como una barrera mecánica completa para las macromoléculas o los antígenos particulados, los sitios de penetración de dichas moléculas incluyen las zonas de extrusión de las vellosidades de las células epiteliales, a través o entre células epiteliales o a través del epitelio linfoespecializado ó células M.

Diversos factores pueden intervenir en la captación y reactividad al antígeno así se sabe, que por ejemplo aunque en el hombre todavía no se han podido demostrar, en el pollo los corticoides suprarrenales, cierran el epitelio intestinal que por un tiempo variable después del nacimiento transporta selectiva o no selectivamente macromoléculas lumbinales⁸⁹.

De igual forma otros factores influyentes son, la naturaleza química del antígeno, la flora colonizante de las mucosas etc...

La preparación inicial de las respuestas inmunológicas mucosas ocurre en el TLRM.^{84,85,86,87}

Trás la estimulación antigénica los linfocitos B, procedentes de la médula ósea y localizados en el TLRM, son activados y emigran a través de los linfáticos eferentes hacia los ganglios linfáticos de drenaje regional (mesentéricos ó mediastínicos, entre otros), donde proliferan y maduran transformandose en células blásticas que contienen IgA, para lo cual necesitan linfocitos T cooperadores o auxiliares.

Una vez desde los ganglios linfáticos regionales, pasan a través de la linfa al conducto torácico y desde aquí a la sangre, para a través de ella volver a albergarse en la lámina propia del tejido mucoso del cual procedían y también en la lámina propia de otras mucosas, distintas a las de su origen.

De aquí se deduce, que existe un intercambio de información mediado por la migración de linfocitos efectores antígeno-específicos desde un sitio de una mucosa, a otros de la misma o a otros tejidos mucosos.

Esto explicaría por qué mujeres embarazadas inmunizadas durante el último mes de gestación con una raza de E.Coli por vía oral, producen un calostro que contiene células plasmáticas productoras de IgA capaces de sintetizar anticuerpos específicos contra ese microorganismo.⁹⁰

Otros datos que contribuyen a confirmar la existencia de esa migración celular entre las distintas mucosas, han sido los obtenidos tras la inmunización oral de voluntarios sanos con *Streptococcus Mutans* (cepa potencialmente relacionada con la producción de caries dental) en los que se ha visto que dicha inmunización va seguida de la aparición de anticuerpos específicos IgA en la saliva y en las lagrimas a la semana de ingestión del antígeno, sin que simultáneamente aparezcan anticuerpos en el suero.⁹¹

Igualmente se han observado anticuerpos IgA específicos, en las secreciones bronquiales, dirigidos contra el E.Coli 06 en animales cuya vejiga urinaria estaba infectada por dicho germen.⁹²

Los trabajos de Watanabe et al⁹³ demostraron igualmente, en estudios realizados con cerdos guineanos inmunizados con ovoalbumina dinitrofenilada, como la inmunización oral con dicho antígeno, se acompañaba al cabo de una semana de la aparición de IgA específica, en la mucosa traqueal y nasal.

Experimentos⁹⁴ realizados en doce niños con doble colecistotomía demostraron que si se los inmuniza en el segmento colónico distal con vacuna polio viva, se detectan anticuerpos específicos de clase IgA, en el segmento local del

colon infectado, pero no en el otro segmento del colon o en los lavados nasales. Una vez cerrada la colecistotomía, la vacuna polio fue administrada por vía oral a tres niños. Una respuesta significativa de clase IgA ocurrió en la nasofaringe.

De aquí se deduce que la inmunización de una superficie mucosa con frecuencia conduce a la producción de anticuerpos con la misma especificidad en otras superficies y apoya el argumento sobre la existencia de un sistema inmunológico mucoso común.^{85,86,91}

A todo este proceso, mediante el que los linfocitos B presentes en el TLRM se transforman en células plasmáticas productoras de IgA y acaban volviendo a localizarse en las láminas propias de esos tejidos mucosos es lo que algunos autores⁹⁵ denominan *Ciclo Celular* de la IgA.

Ciclo Celular de la IgA

Se han postulado dos hipótesis⁹⁵ para la génesis y el mantenimiento del *Ciclo Celular* de la IgA. En ambas se considera que la predeterminación a la producción de IgA no controla por sí sola, la migración de las células B desde la médula ósea a las mucosas. Esta suposición se basa en las siguientes observaciones⁹⁵: -.Los linfocitos T emigran igual

que los Linfocitos B hasta el TLRM; -.La migración no es inhibida por la inyección endovenosa de IgA monomérica o dimerica o por antisuero anticomponente secretorio; -.La lámina propia de los individuos deficientes en IgA está poblada por células plasmáticas que producen otros isotipos.

En la primera hipótesis los Linfocitos B circulantes llegan a los TLRM, bien sea por azar o por selección a nivel de las vénulas del TLRM; se ha demostrado la existencia de una interacción selectiva de los linfocitos B con las células endoteliales⁹⁶.

Estudios de migración in vivo e in vitro, demuestran que estos linfocitos presentan preferencia por las venas poscapilares del endotelio. Las células endoteliales de los tejidos linfoides relacionados con las mucosas, expresan determinantes específicos o factores que median en el reconocimiento de los linfocitos B.⁹⁷

Una vez en estos tejidos reciben dos clases de información mediadas por linfocitos T, en la primera se produce una conmutación o *switch* de los linfocitos B que expresan IgM a linfocitos que expresan IgA, mediante la segunda información, en la que aparte de los linfocitos T median instrucciones procedentes del estroma del TLRM, se permiten que una vez

diferenciados en plasmoblastos esos linfocitos B puedan extravasarse en la lámina propia de la mucosa.⁹⁸

En la segunda hipótesis, se baraja la posibilidad de la existencia de *fenómenos de predeterminación*, para la migración hacia la lámina propia de las mucosas, de los Linfocitos B cuando todavía se encuentran en la médula ósea.

Cuando estos linfocitos llegan a las mucosas por vía sanguínea, se extravasan a la lámina propia en mayor número que en el TLRM, e inmediatamente entran en la linfa que drena hacia los ganglios regionales.

En éstos, los linfocitos B se ponen en contacto con el antígeno, el cual ha llegado a los ganglios regionales a través de la linfa procedente del TLRM y a continuación, por acción del antígeno y de los linfocitos T cooperadores, se produce su transformación en células plasmáticas productoras de IgA, que abandonan los ganglios linfáticos regionales para, a través del conducto torácico, drenar a la sangre y por ella extravasarse hacia la lámina propia de los tejidos mucosos.⁹⁹

La localización de los plasmoblastos, productores de IgA, en las mucosas puede estar afectada por diferentes factores y no por uno sólo así por ejemplo, se ha demostrado que la remoción

de todas las *placas de Peyer* del intestino de la rata no impide que los plasmoblastos productores de IgA, provenientes de los ganglios mesentéricos se localicen en el intestino.

La acumulación de células productoras de IgA en estos sitios especializados se explicaría por la acción de varios factores.⁹⁹

El medio que rodea a las mucosas es rico en antígenos microbianos y mitógenos, influyendo de esta forma en la inmunoespecificidad de los linfocitos de las mucosas. La superposición de estimulación antigénica crónica a la modulación que realizan los linfocitos T vecinos, produciría la predeterminación de las células B a la síntesis de IgA.¹⁰⁰

Tal y como se indicó anteriormente, se ha demostrado la regulación en la producción de IgA por las células T. Se han aislado clones de células T de las *placas de Peyer* de ratones y se ha podido demostrar que estos clones actúan sobre células B estimuladas por lipopolisacáridos, que expresan en su superficie IgM pero no IgA y producen en ellas un reordenamiento del gen específico de inmunoglobulina IgM a IgA mediante un factor soluble¹⁰⁰, estas células T cooperadoras se denominan *células conmutadoras* o *células switch*. (vease más adelante)

También se han descrito células T, que actúan en un estadio mas avanzado de la diferenciación plasmoblástica. Estas células T se caracterizan por presentar por un lado, receptores para la región Fc de la IgA y, por otro, presentan determinantes antigénicos de superficie CD8, asociados normalmente con células T supresoras/citotóxicas. (vease más adelante)

Estas células supresoras, que actúan sobre las células que expresan IgA, pueden suprimir la secreción de dicha inmunoglobulina.

Antígenos del medio ambiente o de la dieta pueden influir en la localización en las mucosas de células productoras de IgA; se ha demostrado que azúcares simples inhiben in vivo varias actividades de los linfocitos B¹⁰¹ y también que el deficit de vitamina A ocasiona una migración y localización defectuosa de los blastos IgA productores.¹⁰²

Captación del Antígeno y Maduración de los Linfocitos B

El primer paso en la producción de IgA por el sistema TLRM consiste en la captación del antígeno por los Linfocitos B y la maduración de estos hacia células plasmáticas.

El reconocimiento de los antígenos por los linfocitos B, puede realizarse de dos formas: una directa en la que el antígeno reacciona o es reconocido directamente por el linfocito B, *antígenos Timo-independientes*, mediante la ayuda de las *células presentadoras de antígenos* (células CPA).

Constituidas éstas últimas por una población leucocitaria heterogénea (macrofagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, etc...) y caracterizadas por poseer en su membrana gran cantidad de antígenos clase II del sistema HLA, constituidos estos a su vez, por cadenas polipeptídicas de 28.000 y 33.000 Daltons respectivamente y con una exquisita capacidad inmunoestimuladora.

Y otra indirecta, la más frecuente, en la que se necesita la colaboración de ambos tipos de linfocitos (B y T) y de las células presentadoras de antígenos, *antígenos Timo-dependientes*.

Las células CPA, representadas principalmente por los macrofagos, tienen varias funciones: por un lado fijarían los antígenos a su membrana a través de los receptores presentes en ella y lo fagocitarían con lo cual controlarían en parte, la cantidad de antígeno puesto a disposición de los linfocitos; y por otro lado, como no todo el antígeno fijado en la membrana

es fagocitado, parte queda expuesto en ella para su presentación a los linfocitos¹⁰³.

Incluso parte de antígeno fagocitado puede, tras ser procesado en el interior de la célula CPA mediante su degradación y unión al RNA ribosomal de la célula, dar lugar a un superantígeno¹⁰³ que sería posteriormente exteriorizado a la superficie de su membrana para su nueva presentación a los linfocitos.

Para algunos autores¹⁰⁴ este antígeno, modificado y reexcretado, sería el responsable de la activación de los linfocitos T, mientras que el antígeno fijado desde un principio en la membrana de la célula CPA, sería el activador de los linfocitos B.

Para jugar su papel en este sistema las *células presentadoras de antígenos*, ha de estar en íntimo contacto con los linfocitos formando agrupaciones celulares, constituidas por una corona de linfocitos dispuesta alrededor de una célula CPA central, que se denominan *islotes inmunológicos*¹⁰⁵.

La unión de los linfocitos a la superficie de las células CPA, se realiza en dos fases sucesivas¹⁰⁵ : en la primera la unión es muy rápida (máximo al cabo de una hora), reversible y

antígeno independiente. Requiere células CPA metabólicamente activas, pero no linfocitos activos y también iones calcio.

Esta unión se debe a la presencia en las células CPA de receptores que ligan a los linfocitos T y B. Mediante esta unión los linfocitos T y B se aproximan al antígeno depositado sobre la superficie de las célula CPA y también, unos a otros con lo que se facilitan como luego veremos las interacciones entre células B y T.

La segunda fase, más lenta (unión máxima a las 20-24 horas) e irreversible, es antígeno-dependiente y precisa de células CPA y linfocitos metabólicamente activos. Además la célula CPA deberá presentar en su superficie antígenos CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) iguales que el linfocito T.

En el primer sistema el reconocimiento antígeno-linfocito B se realiza gracias a unos receptores presentes en la membrana del linfocito que serán los que marquen la especificidad de ese linfocito y de todos los que de él deriven por mitosis, es decir de cada clon. Este reconocimiento del antígeno por las células B puede ser directo, puede reconocerse estando el antígeno en solución o unido a las membranas de las células presentadoras de antígenos¹⁰⁶.

Estos receptores de superficie localizados en los linfocitos B se denominan, *Inmunoglobulinas de Superficie* (IGS) y están caracterizadas por poseer una sola especificidad es decir, la secuencia de aminoácidos de su porción variable la hacen reaccionar únicamente con un sólo determinante antigénico específico e igualmente son idénticas en especificidad, con la que secretaran cuando la progenie de esos linfocitos se hayan diferenciado a células plasmáticas.

Aunque, como ya se ha dicho, la especificidad de las IGS es la misma que la de las inmunoglobulinas secretadas por los plasmocitos, existen diferencias en la *region constante* entre unas y otras; las primeras tienen en su extremo C-terminal una región intramembranal hidrofóbica y una región intracitoplasmática hidrofílica que no existen en las inmunoglobulinas circulantes.¹⁰⁷

Esto permite que las IGS se consideren como proteínas integrales de la membrana del linfocito no pudiendo ser solubilizadas de la membrana por tratamiento salino. Esta posibilidad de atravesar la membrana permite además, el envío al interior de la célula de la señal indicatoria de la unión antígeno-IGS es decir, les permite su función de receptores¹⁰⁸.

El mecanismo de síntesis de estos receptores y el origen de su variabilidad, proviene de reordenamientos de su ADN ocurridos durante la vida fetal y sin que haya intervenido una estimulación antigénica externa¹⁰⁹.

Un dato importante sobre estas IGS es que todas las clases expresadas en la superficie del linfocitos son sintetizadas por él mismo¹¹⁰.

La primera clase de IGS sintetizada por los linfocitos B durante su maduración es la IgM¹¹¹, más tarde y sin que sea necesaria la interacción con el antígeno el linfocito empieza a expresar IgD en su membrana.

Esta secuencia, en la expresión de IGS, justificaría los fenómenos de tolerancia inmunológica; si durante la primera etapa sólo la IgM interactúa con el antígeno, esto da como resultado la tolerancia de ese linfocito y la virtual eliminación funcional del clon que de él hubiera podido resultar. Por el contrario si el antígeno interactúa más tarde en la maduración del linfocito B, cuando ya expresa en su superficie receptores del tipo IgD, se produce la estimulación del clon con desdiferenciación morfológica, división celular y diferenciación hacia plasmocitos¹¹².

Estos linfocitos B que expresan en su membrana IgM e IgD necesitarían, como más adelante veremos, las células T denominadas *conmutadoras* o *células switch*, para poder realizar la transformación de las mencionadas inmunoglobulinas en las demás variantes isotípicas.

Por eso la respuesta inmune producida por antígenos timo-independientes, caracterizados por ser grandes moléculas poliméricas con determinantes antigénicos repetidos y por poseer la capacidad, a altas concentraciones, de activar clones de células B distintas a las específica para ese antígeno, es una respuesta inmune débil, lenta y siempre limitada a la producción de IgM con escasa o nula memoria inmunológica.

Esto es debido a que los linfocitos B que han sido preactivados por antígenos con ayuda de células T pierden su IgD de superficie a medida que ganan receptores para factores solubles de crecimiento y diferenciación producidos por células T activadas.

En el sistema *Timo-dependiente* el reconocimiento del antígeno por la célula B y su posterior transformación en célula plasmática se realiza gracias a la acción conjunta de las células CPA y de los linfocitos T.

En un primer estadio, los antígenos son captados por las células CPA y presentados a los linfocitos T unido a un determinante antigénico CMH tipo II y en menor grado a antígenos CMH clase I. El contacto entre el linfocito T y el antígeno presentado por las células CPA, unido a los antígenos HLA de dichas células, se realiza a través de un receptor localizado en la membrana de los linfocitos T.

Este receptor antígeno-específico consiste en dos cadenas, una *a* ácida de PM (45.000-55.000) y otra *B* más básica de PM (40.000-50.000), ligadas por una unión disulfuro. Ambas son proteínas integrales del linfocito T que prolongan cuatro o cinco aminoácidos hacia el citoplasma

Por los estudios existentes¹¹³ parece que el procesamiento anteriormente visto de los antígenos en la célula CPA, facilita la unión posterior de esos antígenos a las moléculas CMH clase I y II. Se sospecha que en este procesamiento la fagocitosis no es esencial, ya que células no fagocíticas como las dendríticas interdigitadas, pueden procesar antígenos tan grandes como hematíes o micobacterias¹¹⁴.

Por lo tanto, es posible que el procesado tenga lugar en una serie de sitios de la superficie celular o después de pinocitosis o fagocitosis, en endosomas o fagolisosomas. No

existen estudios que permitan confirmar la unión intracelular o en la superficie del antígeno a los determinantes del CMH¹¹⁵ .

Una vez presentado el antígeno en la superficie de las células CPA, se establece un contacto firme, como ya se dijo anteriormente, a nivel de los islotes inmunológicos con los linfocitos T específicos para ese complejo antigénico con el que tiene identidad antigénica CMH¹¹⁵.

En cuanto a la forma en que los linfocitos T reconocen al antígeno existen varias teorías, para algunos autores¹¹⁶ las células T reconocerían por separado, a través de las dos cadenas del receptor, a las moléculas del sistema CMH y al antígeno y para otros¹¹⁷, el reconocimiento sería mediante un único sitio de unión surgido de la interacción de las cadenas *a* y *B* que identificaría a la combinación CMH-antígeno.

Pareciendo esta segunda hipótesis la más acertada, ya que en los estudios realizados hasta el momento, basados en la comparación de las estructuras de las cadenas *alfa* y *beta* de diferentes líneas de células T que reconocen el mismo antígeno en conjunción con diferentes moléculas CMH, han demostrado que dichas estructuras son distintas sugiriendo esto, que una cadena no reconoce simplemente al antígeno y la otra al sistema CMH.¹¹⁸

Junto a este heterodímero receptor localizado en la membrana de los linfocitos T, se han aislado otras moléculas relacionadas con él como son las moléculas CD (*cluster designation*) subdivididas en CD2, CD3, CD4 y CD8¹¹⁹.

En cuanto a la molécula CD2 es el receptor por el cual los linfocitos T forman rosetas con los eritrocitos de carnero, aunque no está aclarado su papel en la función de los linfocitos T, podrían ser una vía alternativa de activación diferente a la mediada por el heterodímero receptor.

Por lo que se refiere a la molécula CD3, parece que su función es la estabilización del receptor antigénico para conservar su conformación, así como que intervenga en la transducción de la señal de activación a través de la membrana celular, al reconocer el receptor al antígeno estimulador del linfocito T.

Las moléculas CD4 y CD8 se cree que no están relacionadas con la activación de la señal antigénica, sino que representan un receptor que puede aumentar las interacciones entre la célula T y su blanco¹²⁰.

Por otra parte, la presencia de moléculas CD4 en linfocitos T indica que están programados para reconocer antígenos unidos

a las moléculas CMH clase II como parte de su especificidad y para realizar una función cooperadora, en la respuesta inmunitaria humoral constituyendo el grupo de linfocitos T_H , linfocitos $CD4^+$ o linfocitos $T4$ en tanto que los que llevan $CD8$ sólo reconocerán los que vayan unidos a las de clase I y tendrían una función primordialmente supresora y citotóxica destinada a inhibir la respuesta inmune, constituyendo el grupo de linfocitos $CD8^+$, $T8$ o linfocitos T_S .¹²¹

Estos linfocitos $T8$ o supresores se cree que pueden ponerse en marcha bien, por la activación de los linfocitos T_H tras la presentación a estos últimos del antígeno por las células CPA o bien, directamente por contacto con el antígeno en ausencia de moléculas CMH clase II¹²² y mediante la secreción por parte del primero de prostaglandinas.

Por ambas vías se produce la activación de una subpoblación linfocitaria denominada *linfocitos T_S inductores* específicos para el antígeno, e $I-J^+$ (determinante antigénico del sistema HLA), estos linfocitos segregan un *factor de supresión de linfocitos T* TSF-1 captado por las células CPA, las cuales reaccionan entonces con un segundo grupo de linfocitos T_S , denominados *traductores*, no antígeno específicos, en los cuales el TSF-1 estimula la secreción del segundo factor de supresión el TSF-2^{123,124}.

Este TSF-2 es igualmente captado por los macrófagos y presentado, a través de estos, a una tercera subpoblación los T_S efectores, que son nuevamente específicos de antígeno y que actúan ejerciendo, de forma directa o mediante un tercer factor el TSF-3, la inhibición de las células B y T_H .

Este mecanismo de supresión estaría controlado por un *feedback* de contrasupresión mediado por otra subpoblación de células T que harían refractarios, mediante diversos factores solubles, a los linfocitos T_H frente a la acción de los linfocitos supresores¹²⁵.

El reconocimiento antigénico estimula por un lado, la producción, por parte de las células CPA, de un factor soluble denominado *Interleucina 1* (IL-1), (Tabla III), polipéptido de un PM aproximado de 17.000 Daltons, del que existen dos subtipos idénticos en cuanto a función, la *interleucina 1a* y la *interleucina 1b*; y por otro la expresión de receptores para la *interleucina 1* en la superficie de los linfocitos T_H ¹²⁶.

Esta IL-1 es capaz también, de actuar directamente sobre los linfocitos B estimulando la proliferación, maduración y diferenciación de los linfocitos B para producir células plasmáticas¹²⁷.

La *interleucina 1* actúa sobre los receptores de los linfocitos T_H (únicamente sobre aquellos linfocitos T_H que no expresan receptores de superficie celular para la aglutinina de maní [PNA⁻])¹²⁸, estimulando la producción por parte de estos, de la *interleucina 2*¹²⁹, glucoproteína de 133 aminoácidos y del denominado *interferón*¹³⁰ tipo II, IFN γ o "interferón inmune", proteína lábil a pH 2.0 caracterizada por estimular la inmunidad celular y humoral, a través de mecanismos tales como el estímulo en la producción de IL-1 y la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B.

Esta IL-2 tiene un efecto inespecífico en la activación de los linfocitos T, la especificidad de su acción la determina la presencia o no de receptores para ella en la membrana de los linfocitos¹²⁹. En efecto, se ha comprobado que sólo después de la interacción con el determinante antigénico, para el cual cada linfocito está predeterminado, aparecen receptores para la IL-2 en dichos linfocitos.

De todas las subpoblaciones linfocitarias la más sensible a la IL-2 es la subpoblación de linfocitos T citotóxico o linfocitos T_C en los cuales estimula su proliferación para pasar de precitotóxicos a citotóxicos. En los linfocitos T_H induce la secreción de otros factores como la IL-3, la IL-4, la

IL-5 y la IL-6 y actúa también sobre los linfocitos B estimulando su proliferación.

La IL-3 parece ser un factor panespecífico¹³¹ estimulador de células troncales multipotentes, facilita la proliferación de células eritroides, mieloides etc...

La IL-4, denominada también BCGF¹³² (factor de crecimiento de células B), o MAF (factor de estimulación de los macrófagos), tiene como funciones principales, la proliferación de células B activadas y la activación de la capacidad tumoricida de los macrófagos.

La IL-5 o BCGF-II¹³³ estimula la proliferación, la secreción de IgM, IgG e IgA y la expresión del receptor IL-2 en linfocitos B activados.

La IL-6 o BCDF¹³⁴ (factor de diferenciación de linfocitos B), induce o estimula la secreción de inmunoglobulinas en células B transformadas.

Llegados a este punto, será la interacción, por una parte, de las células T_H (conmutadoras o switch) también llamadas células *T helper*, mediante la interleucina 5 y la interleucina 1 y por otra del antígeno sobre el linfocito B, la que

producirá su proliferación, maduración y cambio en la clase de inmunoglobulina sintetizada para expresar en su superficie IgA.

Los plasmocitos que se diferencien de estos linfocitos B produzcan inmunoglobulina del tipo A²⁴. Este cambio de isotipo en las inmunoglobulinas expresadas parece estar mediado, como ya dijimos anteriormente, por la IL-5¹³³.

Este cambio de isotipo de Ig expresada en la superficie del linfocito, suele ser directo desde el de IgM a cualquier otro de los isotipos codificados por los genes C_H siguientes cuyo orden es C_μ, C_γ, C_γ₃, C_γ₁, C_α₁, C_γ₂, C_γ₄, C_ε y C_α₂(vease más adelante)¹³⁵.

De todo lo expuesto hasta aquí se deduce la importancia de las células T, a través de su secreción de interleucinas y otros factores, en el proceso de diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas a fin de obtener una buena respuesta de anticuerpos, para que exista la síntesis de las diferentes clases de inmunoglobulinas y para que se establezca memoria inmunológica.

TABLA III

Interleukinas: funciones I

<u>Factor</u>	<u>Efecto</u>	<u>Sinonimia</u>
IL-1	Liberación de linfoquinas en T activadas.	Ep: Pirogeno endógeno
	Proliferación de fibroblastos y células sinoviales y endoteliales.	LAF: Factor activador linfocitos
	Catabolismo celular	LEM: Mediador
	Liberación de prostaglandina E2	endógeno de leucocitos
	colagenasa y proteínas de fase aguda.	Catabolina
	Fiebre	BCAF: Factor
	> actividad células NK	activador
	Quimiotaxis para neutrófilos, macrófagos, linfocitos.	linfocitos B
	Maduración de células pre B	MCF: Factor células mononucleares
IL-2	Proliferación linfocitos T activados	TCGF: Factor F de crecimiento
	Liberación linfoquinas por Linfocitos T activados	TMF/TSF: Factor de maduración y estimulación T
	Activación linfocitos T citotóxicos	TRF: Factor
	> actividad células NK	reemplazante de linfocitos T
	Activación citotóxica de monocitos	KHF: Factor
	Proliferación y diferenciación de linfocitos B activados en presencia de otras interleukinas	colaborador Killer
IL-3	Estimula el crecimiento de célula troncales multipotenciales	MCGF: Factor de crecimiento de célula cebada
	Estimulación células progenitoras eritroides y mieloides	ECSF: Factor
	Mantiene crecimiento células pre B	estimulador
	Mantiene crecimiento células cebadas	de colonias
	Induce la 20 α -hidroxiesteroide dehidrogenasa en células pre T y progenitores hematopoyéticos	eritroides

TABLA III

Interleukinas: funciones II

<u>Factor</u>	<u>Efectos</u>	<u>Sinonimia</u>
IL-4	>proliferación de células B >expresión Ags de clase II para FcE en linfocitos B <secreción de IgG2a,IgG2b e IgM en células B activadas Induce formación células gigantes multinucleadas >actividad tumoricida	BCGF: Factor crecimiento de células B BSF-1,BSFp: Factor estimulatorio de células B MAF: Factor activador macrófagos
IL-5	>expresión de Ags de clase II >proliferación y secreción de IgM,IgG e IgA y la expresión del receptor para IL-2 en linfocitos B. Colabora con la inducción de células T citotóxicas Induce diferenciación de eosinófilos Induce secreción de IgA en blastos estimulados	BCDF II: Factor de crecimiento de linfocitos B TRF,KHF Eo-CSF,EDF: Factor diferenciador de eosinófilos
IL-6	Induce proliferación plasmocitos Induce secreción de Ig en células B transformadas >proliferación timocitos Induce expresión de Ags de clase I en fibroblastos	BCDF: Factor de diferenciación B BSF-2,BSFp2: Factor de estimulación

Células Plasmáticas

La activación de los linfocitos T maduros por cualquiera de las vías antes mencionadas, directamente por el antígeno, indirectamente a través de las interleucinas, etc... ocasiona una serie de cambios morfo-funcionales en dichos linfocitos, conducentes a la formación del último estadio celular de su diferenciación, *la célula plasmática*.

El estímulo de activación del linfocito, produce la puesta en marcha de la *Fosfolipasa C*, enzima relacionada con la membrana del linfocito B, la cual induce un recambio de fosfatidilinosítidos de la membrana (inositol fosfolípido). El desdoblamiento de dicho fosfatidilinositol bifosfato en inositol trifosfato y diacilglicerol, conduce a la movilización de Ca^{2+} y a la activación de la proteína *Cinasa C*¹³⁶, actuando el Ca^{2+} y el diacilglicerol como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares en señales intracelulares.

A nivel de la superficie de la membrana, la activación de los linfocitos B, ocasiona una despolarización eléctrica de la misma, seguida en el transcurso de pocas horas de un aumento brusco en la densidad de las moléculas HLA tipo II imprescindibles, como ya vimos, para la interacción entre los

linfocitos B y T, por fenómenos posteriores se produce la adquisición de receptores para la IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 etc...

A través de todos estos elementos el linfocito B se diferencia y transforma en la célula plasmática, la cual se caracteriza por un tamaño que oscila entre 15-25 micras, de morfología redondeada u ovalada, con bordes ligeramente irregulares. Su citoplasma no es granuloso, se tiñe de azul oscuro y presenta una brillante translucidez, mostrando gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso destinado a la síntesis proteica.

Ese aspecto basófilo es debido a la gran cantidad de RNA que se está utilizando a nivel del retículo endoplasmático rugoso para la síntesis de inmunoglobulinas.

El tinte aterciopelado, designado como azul aciano, azul paloma, etc... es probablemente debido a numerosas mitocondrias no teñidas y a productos de secreción ligeramente teñidos que transmiten la luz a través del citoplasma que contiene numerosos ribosomas azul oscuros (basófilos).

El citoplasma adyacente al núcleo es relativamente pálido formando la denominada *zona clara perinuclear*. Muchas células

plasmáticas contienen vacuolas en las que no se observan partículas fagocitadas.

Los núcleos son relativamente pequeños, ovalados o redondos y excéntricos. La cromatina nuclear es gruesa y conglomerada, a menudo adyacente a las membrana nuclear.

Las inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas dan lugar a variantes morfológicas así tenemos por ejemplo, los *cuerpos de Russell*, glóbulos intracitoplasmáticos formados por apelotonamiento de material proteico inmunológico¹³⁷.

Al microscopio electrónico la célula plasmática madura, es una célula ameboide, grande, con un núcleo oval esférico colocado excéntricamente. El núcleo posee mucha cromatina laxa, reflejando la intensa actividad de síntesis de anticuerpos de estas células; la cromatina densa (hetérocromatina) tiene tendencia a distribuirse alrededor de la membrana nuclear.

Un detalle muy característico es la presencia de un gran nucléolo. El citoplasma esta repleto de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, el cual, durante los periodos de síntesis proteica activa, se dilata y se llena de material amorfo.

Generalmente el aparato de Golgi está bien desarrollado. El citoplasma también contiene algunas mitocondrias redondeadas y ocasionalmente lisosomas. La membrana plasmática es de superficie regular y posee algunas microvellosidades o pseudópodos.

Las células plasmáticas tienen una vida media de 4 días, no encontrándose generalmente circulando en sangre, sino situadas en los ganglios linfáticos, en el TLRM, en la lámina propia de las mucosas, etc...

No suelen presentar inmunoglobulinas de superficie ni otros receptores de membrana, esto hace que sean células que ya no pueden ser activadas ni reguladas negativamente²⁴.

Entre las etapas de linfocito B y de célula plasmática, existe un tipo morfológico funcional de células conocidas como *plasmoblastos*; son células grandes, con una proporción entre núcleo y citoplasma mayor que el de las células plasmáticas. A diferencia de los linfocitos B segregan inmunoglobulinas en forma activa, aunque a un ritmo menor que las células plasmáticas maduras.

Estos *plasmoblastos* constituyen un gran porcentaje de las células secretoras de anticuerpos que se presentan en las

primeras fases de las respuestas de anticuerpos; tienen inmunoglobulinas unidas a su membrana y otros tipos de receptores. Este fenotipo celular constituye la mayor parte de las células secretoras de inmunoglobulinas que se encuentran después de infecciones por virus de Epstein-Barr⁸².

Biosíntesis de las cadenas H y L de la IgA

Una célula plasmática, produce y secreta aproximadamente 2.000 moléculas de IgA antígeno-específica por segundo¹³⁸.

Desde el punto de vista molecular se ha comprobado¹³⁹ que la biosíntesis de las cadenas L y H de la IgA tiene lugar en los ribosomas. Por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, de TLRM de animales inmunizados, se han separado dos picos, correspondientes a conglomerados de 15 a 20 (270-290 S) y 7 a 10 (190 S) ribosomas, respectivamente.

Se ha visto que los primeros son formadores de las cadenas H, y los segundos de las cadenas L. La síntesis de estas últimas dura de 30-40 segundos y las de las cadenas H de 60-90 segundos. Si bien las cadenas L se unen a las H por puentes disulfuro antes de que la síntesis de éstas termine (originando hemimoléculas L-H, que luego formaran el tetrapéptido L-H-H-L monomérico básico de la IgA).

El ensamblaje de las cadenas L, con las H dura entre 5-15 minutos; teniendo lugar el acoplamiento en las cisternas del retículo endoplasmático.

Las cadenas H y L son sintetizadas como precursores que contienen un péptido hidrofóbico adicional de aproximadamente 20 aminoácidos, secuencia ésta que juega un papel en la unión al retículo endoplasmático de los polirribosomas que sintetizan las inmunoglobulinas. Por un mecanismo enzimático las inmunoglobulinas pierden ese péptido antes de ser secretadas (véase más adelante).

Las moléculas completas de inmunoglobulina se acumulan, inicialmente, en las membranas asociadas con los ribosomas y migran luego a otras membranas intracelulares, manteniéndose parte de ellas libres en el citoplasma.

Aproximadamente 30-90 minutos después de su síntesis son excretadas y, es en ese lapso de tiempo, en el que fijan las moléculas de hidratos de carbono, fijación ésta que se realiza tanto en el citoplasma de la célula como durante el paso de la inmunoglobulina a través de las estructuras membranosas de la misma¹⁴⁰.

Una molécula de inmunoglobulina pasa 2/3 de su vida intracelular dentro del retículo endoplasmico y 1/3 en el aparato de Golgi, en el cual se forma la vacuola secretora de la inmunoglobulina.

Ultimamente¹⁴¹, se ha descrito una proteína, designada *proteína de unión de las cadenas H* o BIP (heavy chain binding protein), que sería la responsable del transporte de monómero básico de IgA, el L-H-H-L, resultante del ensamblaje de las cadenas L y H. El mecanismo propuesto para ello sería el siguiente: las cadenas H sintetizadas en los ribosomas (270-290 S) son traslocadas al lumen del retículo endoplasmico donde enseguida se unen al BIP, la cual interfiere con la señal de expresión del transporte en las cadenas H. Si no se sintetizan cadenas L, el BIP queda unido a la cadena H y ésta se degrada en el interior de la célula.

En cambio si hubo producción de cadenas L, cuando éstas se acoplan a las cadenas H la proteína BIP se disocia rápidamente, entonces la señal de transporte se expresa y se inicia la migración de la inmunoglobulina hacia el Golgi.

Este mecanismo trataría de explicar por qué no hay acumulación de cadenas H en el citoplasma de las células que las sintetizan.

Las cadenas L que están en exceso, y no se une a cadenas H para formar inmunoglobulinas, son excretadas por orina dado su bajo peso molecular. La vida media de la IgA secretada es de 4-5 días.

Por lo que se refiere al ordenamiento y distribución de los genes que codifican la síntesis de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de la IgA, se sabe que estas últimas tienen su síntesis codificada en cromosomas diferente según sean cadenas L tipo Kappa o Lambda¹⁴². (Tabla IV)

En las Kappa, la cadena de genes que la codifican, ésta localizada en el cromosoma 2. Las células poseen un único genes, gen C_K que codifica la región constante de dicha cadena es decir para los aminoácidos del 109-214, y alejados, aunque en el mismo cromosoma se hallan los genes que codifican la parte variable de la cadena Kappa, genes V_K , aproximadamente unos treinta genes. Cada gen V_K está precedido por un pequeño exón, exón L_K , de aproximadamente 60 nucleótidos que codifica el péptido *señal*, péptido que permite a la proteína atravesar las membranas del retículo endoplasmático para su secreción o expresión superficial.

El exón V_K codifica para los tres últimos residuos del péptido *señal* y los aminoácidos del 1 al 95 de la región

variable de la proteína. Los trece residuos del tramo 96-108 están codificados por un exón separado llamado J_K , del cual hay cinco copias diferentes, separadas entre sí por unos 300 nucleótidos y ubicadas a unos 3.000 nucleótidos del gen C_K .

Las cadenas ligeras Lambda están codificadas por una cadena de genes localizada en el cromosoma 22. En ésta existen seis genes para la parte constante de dicha cadena, genes C_L , precedido cada uno de su correspondiente gen J_L , y unos 20 que codifican la parte variable, los denominados genes V_L .

Las cadenas pesadas a_1 y a_2 , están codificadas por genes localizados en el cromosoma 14, los genes que codifican la parte variable de dichas cadenas, genes V_H , se estiman en unos 200 y contribuyen con 98 de los 120 codones de la región variable de la proteína y cada uno está precedido de un exón L_H que codifica para el péptido señal. A partir del codón 99 y hasta el 102, donde empiezan los genes J_H , se sitúa el gen D_H que codifica la zona de hipervariabilidad de las cadenas pesadas.

Muy cercano al gen J_H se encuentran los genes que codifican las regiones constantes de las cadenas H en el orden siguiente: Cu , Cd , Cy_3 , Cy_1 , Ce_2 , Ca_1 , Cy_2 , Cy_4 , Ce_2 , Ca_2 (el gen Ce_2 no es funcionante).

Tal y como se indicó anteriormente, durante la respuesta inmune se produce el cambio o conmutación, *Switching*, mediante el cual un linfocito deja de expresar IgM en su superficie para expresar IgA, con el fin de en un segundo estadio transformarse en célula plasmática productora de IgA¹⁴³.

Este cambio se realiza con la ayuda de los factores anteriormente expuestos, y consiste básicamente en fenómenos de recombinación de los genes C_H , con lo que se consigue aproximar el complejo $L_H-D_H-J_H$ al gen Ca_1 o Ca_2 con el fin de transformar la secreción IgM en IgA1 o IgA2, respectivamente¹⁴³.

En lo referente a los mecanismos de recombinación para el cambio del gen C_H hay evidencias¹⁴⁴ de que los más frecuentes serían: el acercamiento de dos regiones S (las regiones S son áreas o secuencias situadas delante de los genes C_H caracterizadas por la presencia de unidades repetidas numerosas veces, la región Sa posee un segmento de 80 bases repetido por lo menos 15 veces y la recombinación ocurre siempre dentro de ese tramo de 80 aminoácidos) con posterior delección del DNA situado entre ambas, y el *crosing over* o sobrecruzamiento desigual entre cromátides humanas.

Trás estos reordenamientos los genes V de las cadenas H y L, sufren también cambios puntuales en su secuencia nucleótida, este proceso se denomina *mutación somática*.

3.2.2.3.- SECRECION DE LA IGA EN LAS SUPERFICIES MUCOSAS

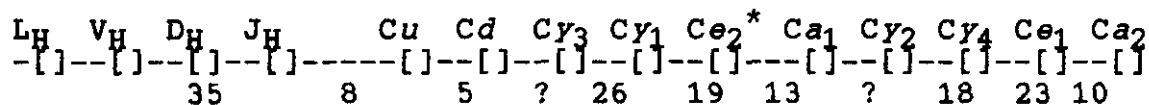
A parte de la pequeña cantidad, que como se indicó más arriba, procedía directamente de un fenómeno de difusión pasiva desde el plasma, la IgA presente en las secreciones mucosas es producida en las células inmunes existentes en la lamina propia de los tejidos mucosos.

Una vez sintetizada y almacenada la IgA en las células plasmáticas, pertenecientes al TLRM y localizadas en la lámina propia del tejido mucoso, se procede a su secreción hacia el exterior.

Cuando los plasmocitos de la lámina propia de las superficies mucosas sintetizan la IgA, es transportada a través del epitelio mucoso para realizar su función en las secreciones externas. La secreción selectiva de la IgA es promovida por algunas características estructurales de esta inmunoglobulina, ya vistas anteriormente, que le permiten unirse al receptor específico para su transporte, el *componente secretor* (CS).

TABLA IV

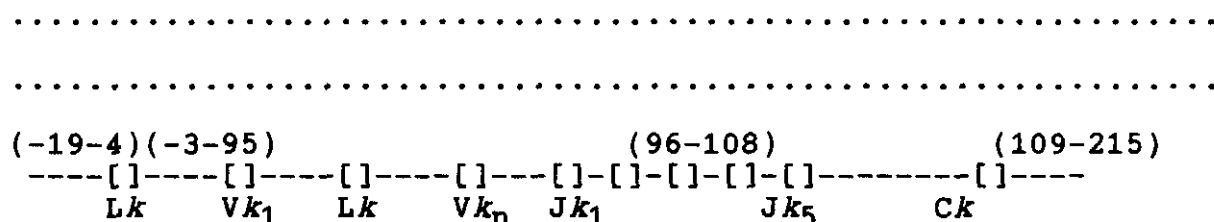
Genes codificadores de las cadenas H y L de la IgA



Organización de los genes codificadores de cadenas H

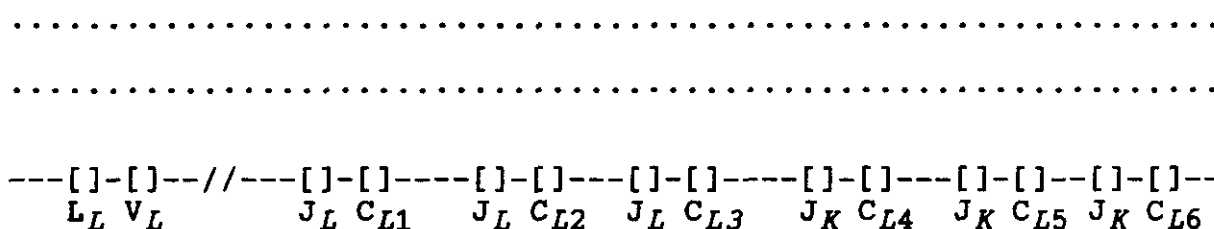
Los números indican las distancias aproximadas en Kb (o la distancia desconocida ?) entre los distintos genes.

* Gen no funcionante



Organización de los genes codificadores de cadenas L Kappa

Los números entre parentesis indican los aminoácidos codificados por cada segmento



Organización de los genes codificadores de cadenas L Lambda

La linea cortada indica que se desconoce la distancia entre las familias de genes

Estas características estructurales son en un breve recuerdo; la existencia en la cadena pesada *a* de un octapéptido C-terminal adicional con un penúltimo residuo de cisteína que es capaz de unirse covalentemente a la *cadena J*, para formar polímeros a partir de la molécula monómerica de IgA. Dicha *cadena J* es un polipéptido sintetizado igualmente por las células plasmáticas.

La unión de la IgA monómerica y la *cadena J* se realiza en el citoplasma de la célula, justo antes de ser secretada la IgA mediante vacuolas producidas en el aparato de Golgi.

Esas IgA poliméricas son secretadas y atraviesan la lámina propia de las mucosas introduciéndose en las células epiteliales, donde se une al *componente secretor*, el cual no es más que una proteína, expresada como una proteína integral de membrana, localizada en la membrana basolateral de las células epiteliales mucosas. Este (CS) es continuamente endocitizado y unido en parte a los polímeros de IgA, para ser eliminados como una estructura única CS-IgA a través de la membrana apical de la célula epitelial mucosa. Al parecer para la unión del (CS) a la IgA es necesario que ésta esté en su forma estructural de polímeros.¹⁴⁵

Este proceso de transporte es único, porque promueve la captación y transporte de una proteína grande sin entrar en la vía de degradación lisosómica¹⁴⁵. Además el (CS) debe resíntetarse de continuo ya que a diferencia de muchos receptores de transporte, no es reciclado.

3.2.2.4 - PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA IGA

La IgA secretoria al parecer tiene propiedades únicas que pueden explicar su predominancia en las mucosas. (Tabla V)

Tanto su estructura polimérica como su unión al componente *secretor* le confiere gran resistencia al ataque por las enzimas proteolíticas existentes en las secreciones mucosas. Estas proteasas son liberadas entre otros, por los microorganismos existentes en las mucosas y son capaces de hidrolizar las cadenas pesadas de la IgA clase 1,¹⁴⁵ lo cual justificaría o explicaría el predominio de la IgA tipo 2 en las secreciones mucosas.

La IgA es igualmente un mal activador de la vía clásica del complemento, es más se cree¹⁴⁶ que los anticuerpos IgA pueden inhibir por competencia la función activadora del complemento por la IgG. Se ha planteado la hipótesis, todavía en estudio,

de que la carencia de función activadora de la IgA para el sistema del complemento, tenga como finalidad atenuar el potencial inflamatorio de los anticuerpos IgG en la superficie epitelial mucosa¹⁴⁶.

Otros estudios¹⁴⁶, afirman que la IgA puede activar la vía alternativa de activación del complemento y con ello proporcionar cierta función protectora y promover la inflamación en cierto grado.

Igualmente se han descrito^{147,148} receptores para la IgA en células inflamatorias que tal vez promueven la destrucción de patógenos celulares (bacterias, parásitos, etc...) por citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo.

La función antimicrobiana de la IgA parece ejercerse principalmente¹⁴⁹ por su unión a epítopes antígenicos en microorganismos, con lo cual restringe su movilidad o impide que se unan al epitelio mucoso¹⁵⁰. Así por ejemplo tenemos los trabajos Samra, Ganguly y Mahajan¹⁵¹ en los cuales se demuestra el efecto antiadherente que la IgA presente en la secreción láctea humana, tiene para los trofozoitos de la Giardia Lamblia situados sobre columnas de fibra de nylon o sobre superficies de cristal y/o la mucosa intestinal.

La necesidad funcional de IgA claramente no es absoluta, ya que muchos individuos con deficiencia de IgA son aparentemente sanos¹⁵².

Sin embargo, el hecho de que estas personas tengan mayor frecuencia de infecciones mucosas, atopia, enfermedades autoinmunitarias y absorción de antígenos de los alimentos, indica claramente que la IgA tiene un papel en el sistema inmunológico multicomponente¹⁵².

A nivel de las secreciones mucosas se ha observado que la IgA⁷ actúa sobre las propiedades viscoelásticas de las secreciones de las vías aéreas, mejorándolas, por lo que parece tener una misión de reestructuración molecular, incrementando los módulos de elasticidad y viscosidad.

La IgA puede jugar un papel importante en la degranulación de los eosinófilos¹⁵³ en los procesos infecciosos pulmonares, sobre todo los ocasionados por helmintos y en las enfermedades pulmonares por hipersensibilidad especialmente en el asma bronquial.

Se sabe poco sobre la función de la IgA sérica, la cual se encuentra en un 10% como polímero y un 90% en forma monomérica, su papel en la protección inmunológica esta poco aclarado, pero

quizás, sea importante en la eliminación del antígeno y la regulación inmunológica.

Se ha pensado¹⁵⁴ que interviene en varios procesos patológicos como la dermatitis herpetiforme, la nefropatía por IgA y el penfigoide ampollar¹⁵⁵ .

También se ha descrito la función de la IgA sérica como factor reumatoide, en procesos tales como Lupus Eritematoso, Espondilitis Anquilopoyética, y Poliarteritis nodosa¹⁵⁴.

En el caso de la Dermatitis herpetiforme, parece ser que los depósitos de IgA subcutaneos son secundarios a una lesión de la mucosa intestinal, por las IgA producidas contra, probablemente el gluten, esa mucosa dañada permitiría el paso a sangre de moléculas de IgA que acabarían depositándose en la piel.

TABLA V

Propiedades y funciones de la IgA

Resiste la proteólisis

Bloquea:

- Captación del antígeno*
- Fijación bacteriana o viral*
- Lisis dependiente del Complemento*
- Actividad de toxinas*
- Reacciones alérgicas*

Limita la Inflamación:

- Fijación mínima del complemento por vía clásica*
- Puede actuar por vía alternativa*
- Ayuda a eliminar el antígeno adsorbido*
- Bloquea la bacteriólisis*

Se une a células T reguladoras, que pueden ayudar a controlar la concentración de IgA.

Se une a diferentes leucocitos y puede participar en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo.

3.3.- ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA (E.P.O.C.)

La terminología ha constituido un obstáculo persistente para comprender y evaluar las enfermedades obstructivas de las vías aéreas. Así por ejemplo, hace solo 30 años el término *bronquitis crónica* significaba una cosa en Inglaterra y otra distinta en Estados Unidos.

Una de las principales razones de la terminología ambigua que aún persiste, radica en el monopolio que los médicos especialistas en enfermedades del tórax han ejercido desde los tiempos de Laennec sobre la relación estructura-función.

Por otro lado los médicos generales, con una visión más pragmática han desestimado la necesidad de buscar definiciones más exactas, pues los términos amplios y vagos usados hasta el momento actual, les han resultado suficientes para tratar a sus enfermos.

Aunque todavía no existe un acuerdo general entre los especialistas sobre la terminología de las enfermedades obstructivas de las vías aéreas, sí podemos afirmar que dentro del amplio espectro que abarca a dichas enfermedades, el denominador común radica en un aumento de la resistencia de las vías aéreas frente a la respiración.

Por lo tanto en general el término *enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas* posee las mismas implicaciones de significado del término de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (E.P.O.C.).

Los cuadros de E.P.O.C. son los más frecuentes entre todos los procesos crónicos torácicos con algunos de los cuales pueden confundirse, ya que estos últimos pueden cursar con una limitación al flujo aéreo más o menos encubierta. (Tabla VI)

TABLA VI

Enfermedades pulmonares crónicas más frecuentes

-
- a. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (E.P.O.C.)
 - b. Enfermedades secundarias a lesiones tuberculosas cicatrizales o a secuelas terapéuticos de la misma
 - c. Enfermedades secundarias a anomalías de la caja torácica y/o a obesidad.
 - d. Otras enfermedades pulmonares crónicas (fibrosis pulmonar difusa, sarcoidosis y algunas vasculitis entre otras)
-

De los procesos reflejados en la tabla anterior los cuatro primeros tienen muchos rasgos comunes, lo cual hace que muchas veces se agrupen todos bajo el epígrafe de E.P.O.C.

Pero las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas agrupan a una serie de procesos patológicos bien conocidos y diferenciados, que tienen poco que ver con los cuadros que se incluyen en los otros tres apartados siguientes, si bien hay

que reconocer la existencia de síntomas y signos parecidos: disnea de esfuerzo, a veces hipersecreción bronquial, poliglobulia, posible existencia de hipercapnia en sus frecuentes agudizaciones y un final casi siempre común: *el cor pulmonale crónico*.

Además, aunque en las lesiones de la caja torácica como la cifoescoliosis, o las lesiones residuales post-tuberculosas se espera encontrar un patrón funcional restrictivo puro, en la práctica diaria y sobre todo en las fases avanzadas de dichas enfermedades, lo más frecuente es encontrar un patrón mixto o incluso obstructivo, que probablemente sea secundario al hábito de fumar, a las frecuentes sobreinfecciones asociadas o a las lesiones concomitantes en la vía aérea.

En esta introducción a las enfermedades obstructivas de las vías aéreas debemos hacer una breve mención a la enfermedad obstructiva de las *vías aéreas pequeñas*, término que se utiliza para describir las alteraciones de la función pulmonar asociadas a trastornos inflamatorios y obliterativos de las vías aéreas pequeñas, en particular de los bronquiolos.¹⁵⁶

El proceso inflamatorio tiene su origen casi siempre, en el contacto con agentes irritativos inhalados; aparte de la bronquiolitis respiratoria y la hipersecreción mucosa, ésta

enfermedad puede también asociarse a una amplia variedad de lesiones al mismo nivel: úlceras, metaplasia, etc...

Se considera por algunos autores¹⁵⁶ que ésta enfermedad obstructiva de las vías aéreas pequeñas es un paso previo al desarrollo de un cuadro de E.P.O.C., que aparece mucho antes de que las pruebas funcionales, como el FEV₁ o la ventilación voluntaria máxima (VVM), muestren resultados anormales; este factor junto a la posibilidad de que sea un cuadro reversible debe potenciar el intento de su diagnóstico precoz.

El concepto de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica hay que entenderlo como un síndrome que agrupa a una serie de entidades cuya característica común es la limitación crónica al flujo aéreo, que se objetiva mediante pruebas funcionales respiratorias las cuales muestran una disminución del flujo espiratorio máximo en un segundo (V.E.M.S.) y del índice VEMS/FVC, siendo FVC la capacidad vital forzada¹⁵⁷.

Las entidades clínicas que se agrupan dentro del concepto de E.P.O.C. son básicamente^{158,159}:

- *Bronquitis Crónica Obstructiva*: Cuadro clínico caracterizado por tos productiva o expectoración durante más de 90 días al año y más de 2 años consecutivos, no explicable por

otra enfermedad y que se acompaña de una limitación crónica al flujo aéreo.

- . *Enfisema*: Cuadro clínico caracterizado por el aumento de los espacios aéreos pulmonares, situados más allá del bronquiolo terminal, acompañándose de destrucción de paredes alveolares.

- . *Asma Bronquial*: Cuadro clínico caracterizado por el estrechamiento difuso de la luz bronquial, de intensidad rápidamente variable y que cede espontáneamente o bajo tratamiento.

- . *Bronquiectasias*: Cuadro clínico caracterizado por una dilatación permanente y anormal de los bronquios que comporta generalmente una importante hipersecreción mucosa bronquial.

Las delimitación del concepto de E.P.O.C en mayor o menor grado se acompaña de un cierto confucionismo, algunos autores¹⁶⁰ engloban dentro de este concepto tanto a las enfermedades antes mencionadas como a los cuadros de *bronquiolitis*

Con el concepto de E.P.O.C. lo que se intenta es agrupar a todos aquellos sujetos que en su clínica presenta un cuadro mezclado de los anteriormente indicados procesos patológicos, ya que con el paso del tiempo un sujeto con un cuadro clínico de bronquitis crónica, puede asumir en mayor o menor grado características propias del enfisema, etc....

Sigue existiendo gran interés por cuantificar la contribución relativa de la bronquitis y el enfisema al cuadro clínico de cada paciente en particular, pues la historia natural depende en último término del componente predominante.

Sin embargo, el intento loable de separar y cuantificar el grado de bronquitis crónica y de enfisema no debe enturbiar el concepto de que considerar las dos entidades globalmente en el contexto de las *enfermedades pulmonares obstructivas crónicas* ha dado sus frutos.

Uno de ellos ha consistido en reafirmar el enorme valor de la espirometría para detectar las enfermedades de las vías aéreas y para seguir su evolución. Así por ejemplo, puede asumirse la presencia de obstrucción cuando están disminuidos el FEV_1 y los flujos máximos y prolongado el tiempo de espiración forzada.

Por ello el concepto de E.P.O.C.¹⁶¹ debe entenderse como la presencia de alguna de las enfermedades anteriormente citadas sin presentar de una manera pura las características antes mencionadas (bronquitis crónica obstructiva, enfisema) o las presenta mezcladas con las propias de los otros grupos.

Las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas representan las enfermedades de mayor mortalidad entre todas las enfermedades respiratorias. El índice de mortalidad en España por cuadros de E.P.O.C. se sitúa en 30 por cada 100.000 habitantes al año. En Estados Unidos se les atribuye el 3% de todas las muertes ocurridas al año y en orden de frecuencia de causa específica de fallecimiento, ocupa el quinto lugar.

Desde 1970 la frecuencia de estas enfermedades ha aumentado casi el doble como causa subyacente de muerte; además se ha observado un aumento de la proporción de muertes en las mujeres. La relación varones-hembras era de 4.3:1 en 1970 y en 1990 es de 2.30:1 ¹⁶².

3.3.1 - E.P.O.C.-BRONQUITIS CRONICA

La bronquitis crónica se definió en la década de 1950 (*Symposium CIBA* [1958] por "la presencia de tos y expectoración durante 3 meses al año más de 2 años consecutivos siempre y cuando no fuera producido por una enfermedad específica del aparato respiratorio". En la tabla VII se especifican los criterios para el diagnóstico de la bronquitis crónica.

TABLA VII

Criterios diagnósticos de Bronquitis Crónica

1. Hipersecreción de moco

Tos y expectoración durante 3 meses al año y dos años seguidos.

Hora del día no crítica (no se exige "tos de fumador" matinal).

Estación no crítica.

Sibilancias no forman parte formal de la definición.

Calidad del esputo (claro, purulento, mucopurulento) no crítica.

2. Obstrucción crónica del flujo aéreo

FEV₁ inferior al 65% del teórico, teniendo en cuenta edad sexo y altura.

Relación FEV₁/FVC inferior al 70% de la teórica.

Sin embargo a pesar de intentar restringir, con esta definición, el concepto de *bronquitis crónica* este término se ha seguido utilizando en el uso popular, para una extensa gama de enfermedades de la vía aérea que comprende desde la simple

hipersecreción de moco por un lado, hasta la obstrucción del flujo aéreo por el otro, (definida en general por un FEV_1 bajo, es decir menor del 65% del teórico para la edad, el sexo y la altura, o una relación FEV_1/FVC baja).

Esta dicotomía ha favorecido la ambigüedad en la definición de *bronquitis crónica* y oscurecido la investigación de la interpretación, cuando se presupone que la hipersecreción de moco es relevante para el problema de la obstrucción del flujo de aire, que tiene mayor importancia desde el punto de vista clínico.

De hecho ahora¹⁶³ parece claro que ni la presencia de hipersecreción de moco ni su curso, guardan relación con la tasa de deterioro de la función pulmonar (definida por el descenso a largo plazo del FEV_1), ni con la mortalidad por obstrucción del flujo aéreo.

Por ello para superar las ambigüedades inherentes al término de *bronquitis crónica*, nosotros utilizamos esta denominación cuando nos referimos al espectro de enfermedades en las que la hipersecreción de moco constituye el dato predominante. Al usarlo de esta forma no se tiene en cuenta la evidencia de obstrucción de las vías aéreas; también se excluye el broncoespasmo como característica dominante de la enfermedad.

La bronquitis crónica es una enfermedad común, de hecho su tasa de prevalencia oscila entre el 3,6% entre los 45 y los 64 años, y el 4,5% después de los 65 años. Ocupa el quinto lugar como causa de mortalidad (3,3% de las muertes totales) y su frecuencia ha aumentado progresivamente durante los últimos 25 años. Entre los 45-54 años, la mortalidad de las mujeres se aproximó a la de los varones, lo que sugiere que la mayor mortalidad que antiguamente existía en los segundos estaba relacionado con el mayor consumo por parte de estos de tabaco.

A) Etiología

1.- Tabaco

El consumo de cigarrillos es el determinante más importante en la etiología de los cuadros de bronquitis crónica, siendo el factor más relacionado con la hipersecreción de moco y obstrucción del flujo aéreo.

Los fumadores tienen aproximadamente 10 veces más probabilidades de morir por bronquitis crónica que los no fumadores.

Los estudios experimentales¹⁶² han demostrado que el consumo prolongado del tabaco altera la motilidad ciliar,

inhibe la función de los macrófagos alveolares y produce hipertrofia e hiperplasia de las glándulas mucosecretoras; en perros la exposición masiva al humo del tabaco produce cambios de tipo bronquítico.

En experimentos longitudinales¹⁶⁴ se ha comprobado que los fumadores activos sufren descensos del FEV₁ 2 o 3 veces mayores que las personas que nunca han fumado.

Además de estos efectos crónicos es probable que las sustancias presentes en el humo del tabaco inhiban las antiproteasas y favorezcan la liberación aguda de enzimas proteolíticas por los leucocitos polimorfonucleares¹⁶⁵.

El humo inhalado es capaz de actuar sobre la distensibilidad o capacidad de acoplamiento del pulmón, disminuyendola, e igualmente es capaz de aumentar las resistencias aéreas, debido a su acción sobre el músculo liso bronquial, por acción directa de estimulación del vago. La relación entre estos episodios recurrentes de obstrucción bronquial aguda y el desarrollo progresivo de la obstrucción crónica de las vías respiratorias es todavía desconocido.

El abandono del hábito de fumar se asocia¹⁶⁴ con la disminución del riesgo de mortalidad por bronquitis crónica,

directamente relacionada con el número de años transcurridos desde que el individuo dejó de fumar.

Recientemente se ha prestado atención a los efectos de la inhalación de humo en los no fumadores¹⁶⁴. La prevalencia de síntomas respiratorios sobre todo tos y sibilancias, tiende a ser mayor (y menor la función ventilatoria de los pulmones) en las viudas no fumadoras de varones que habían fumado. Aún siendo pequeño el efecto que esto tiene, es importante debido a la frecuencia de la exposición y también a causa de su carácter pasivo.

2.- Contaminación ambiental

Los clásicos episodios de intensa contaminación ocurridos en el valle del Mosa¹⁶⁶ demostraron sin lugar a dudas, que las brumas pueden lesionar y matar a las personas. Los pacientes con enfermedad crónica previa sobre todo de los pulmones o del corazón resultaron especialmente vulnerables, pero el comienzo ocasional de síntomas en niños pequeños y animales, así como las recidivas en pacientes asintomáticos, indicaron que la bruma puede iniciar o agravar cuadros de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Las exacerbaciones de los cuadros de bronquitis crónica están en clara relación con los periodos o las circunstancias de alta contaminación por dióxido de azufre (SO₂) y material particulado¹⁶⁶.

La acción del frío, bien directamente o a través de la niebla, que actúa como aerosol de agua fría aumenta las resistencias aéreas sobre todo en los sujetos con hiperreactividad bronquial.

3.- Infección

La morbilidad y mortalidad de las infecciones respiratorias agudas son más frecuentes en los sujetos afectos de E.P.O.C. Se han hecho¹⁶⁷ muchos intentos de relacionar estas enfermedades con infecciones por virus, micoplasmas y bacterias. Sin embargo, solo los rinovirus se encuentran con más frecuencia que en los sujetos normales durante las exacerbaciones de estas enfermedades.

4.- Profesión

Desde los tiempos de Ramazzini¹⁶⁸ la exposición laboral se ha considerado uno de los factores más importantes en la etiología de las enfermedades respiratorias. Collis fue el

primero en considerar la relación de las E.P.O.C. con el polvo; la relación cuantitativa entre exposición al polvo durante toda la vida y las E.P.O.C. ha sido investigada con más detalle en los mineros del carbón, en ellos no se ha observado que la cantidad de polvo inhalado guarde una relación directa con el grado de enfermedad pulmonar obstructiva crónica¹⁶⁸.

La cantidad de polvo inhalada durante toda la vida quizás guarde una relación más estrecha con la enfermedad y la incapacidad en las ocupaciones que implican exposición a sustancias distintas del carbón. Así entre los mineros del metal de Estados Unidos la prevalencia de síntomas respiratorios era mayor en aquellos con silicosis que en los que no la padecen, datos similares se han obtenido en los mineros que trabajan con asbesto y los molineros¹⁶⁸.

Al parecer la exposición a polvos vegetales está más relacionada con los cuadros de E.P.O.C. que la inhalación de polvos minerales, ello pudiera ser debido al efecto sumatorio de la irritación bronquial asociada a sensibilización alérgica¹⁶⁸.

5.- Factores genéticos

La menor incidencia de E.P.O.C. en la mujer y las diferentes respuestas de la función pulmonar¹⁶¹ entre jóvenes fumadores según el sexo, inclinan a pensar que tal vez exista un factor de protección ligado al cromosoma XX.

Junto a esta idea varios factores han ayudado a reforzar la idea de una intervención genética en el desarrollo de los cuadros de E.P.O.C.: a) los familiares de pacientes bronquíticos muestran una mayor prevalencia de sufrirla que los de los sujetos control; b) los hermanos de pacientes con bronquitis crónica suelen sufrir enfermedades pulmonares crónicas con mayor frecuencia que sus cónyuges; c) el FEV₁ es más similar entre los miembros de la familia que entre los esposos; d) las tasas de concordancia son mayores entre los gemelos monocigóticos que entre los dicigóticos.

La observación del genotipo Pi ZZ de deficiencia de α_1 -antitripsina ha demostrado una asociación clara con la obstrucción crónica del flujo aéreo, tanto solo como en combinación con el consumo de tabaco; no se encontró asociación entre el genotipo Pi ZZ y la hipersecreción de moco¹⁶¹.

B) Patogenia

Los primeros estudios de los epidemiólogos ingleses sugirieron que la hipersecreción de moco (bronquitis crónica) procedía de la exposición a una variedad de irritantes inhalados, como el humo de tabaco y los contaminantes de la polución aérea. Se sugirió¹⁶⁹ una secuencia en la que la producción aumentada de moco se asociaba a bloqueo de las vías aéreas y eliminación reducida de la mucosidad preparando el terreno para las infecciones recurrentes; se creía que estas infecciones repetidas causaban a su vez lesión de las vías aéreas pulmonares y destrucción de los espacios aéreos, culminando así una obstrucción irreversible del flujo aéreo.

Sin embargo esta hipótesis, de relación, en la que la hipersecreción de moco y los episodios de enfermedades respiratorias se entremezclan con los orígenes y la perpetuación de la anomalía obstructiva no se ha podido demostrar, tampoco se ha podido demostrar que el tabaco intervenga de forma conjunta en los procesos paralelos de hipersecreción de moco y obstrucción al flujo aéreo.

Igualmente no se ha podido demostrar una tercera hipótesis que atribuye la hipersensibilidad alérgica de las vías aéreas a una variedad de agresiones; de acuerdo con este concepto la

hipersecreción mucosa sería una manifestación de hipersensibilidad y lo mismo ocurriría con la respuesta aumentada de las vías aéreas a la histamina¹⁶⁹; se cree que las infecciones recurrentes son secundarias a broncoconstricción la cual a su vez, disminuye la capacidad de la vía aérea para eliminar los agentes microbianos. Sin embargo los estudios epidemiológicos y clínicos no han aclarado este tema.

Como norma en los sujetos con hipersecreción mucosa crónica (bronquitis crónica) está aumentado el tamaño de las glándulas seromucosas traqueobronquiales y el volumen proporcional de la porción secretora de moco de dichas glándulas, en comparación con la porción de secreción serosa.

Hoy en día la idea prevalente¹⁶⁹ sobre el fenómeno fisiopatológico primario en el desarrollo de la obstrucción crónica del flujo aéreo, se basa en que ésta radica en las vías aéreas pequeñas del pulmón (vías no alveoladas < 2 mm de diámetro interno). Se supone que la lesión inicial aparece en los bronquiolos respiratorios en los cuales se forman agregados de macrófagos pigmentados, apareciendo fenómenos de inflamación de las paredes bronquiolares y alveolares adyacentes.

Esta bronquiolitis conduciría a metaplasia escamosa, denudación del epitelio, fibrosis mural, metaplasia de las

células en copa, presencia de moco intraluminal e hipertrofia de la capa muscular de las vías aéreas.

C) Anatomía patológica

En los cuadros de E.P.O.C. suelen presentarse en mayor o menor grado, según la tendencia predominante en dichos cuadros, alteraciones a nivel de la mucosa bronquial caracterizadas por un aumento del índice grosor glándula-pared y un aumento del número de células secretoras en el epitelio superficial.

En la bronquitis crónica el epitelio muestra una proliferación evidente de las células caliciformes y una disminución de las células del epitelio vibrátil, llegando en ocasiones a la destrucción focal completa.

El epitelio bronquial puede presentar varios grados de lesión¹⁷⁰:

- . *Hiperplasia de las células basales*, como expresión de la actividad regeneradora aumentada para reparar la mucosa alterada por la inflamación.

- . *Metaplasia escamosa y micropapilosa* con estratificación epidermiforme y tendencia a la queratinización.

Este tipo de lesión se observa en el 70% de los fumadores, la metaplasia papilomatosa se caracteriza por la protusión de la papila del estroma hacia el epitelio superficial.

- . *Displasia*, en la que existe pérdida de la arquitectura normal, con cromatina nuclear anormal y relación núcleo-citoplasma elevada. La transición de esta lesión a carcinoma *in situ* es fácil.

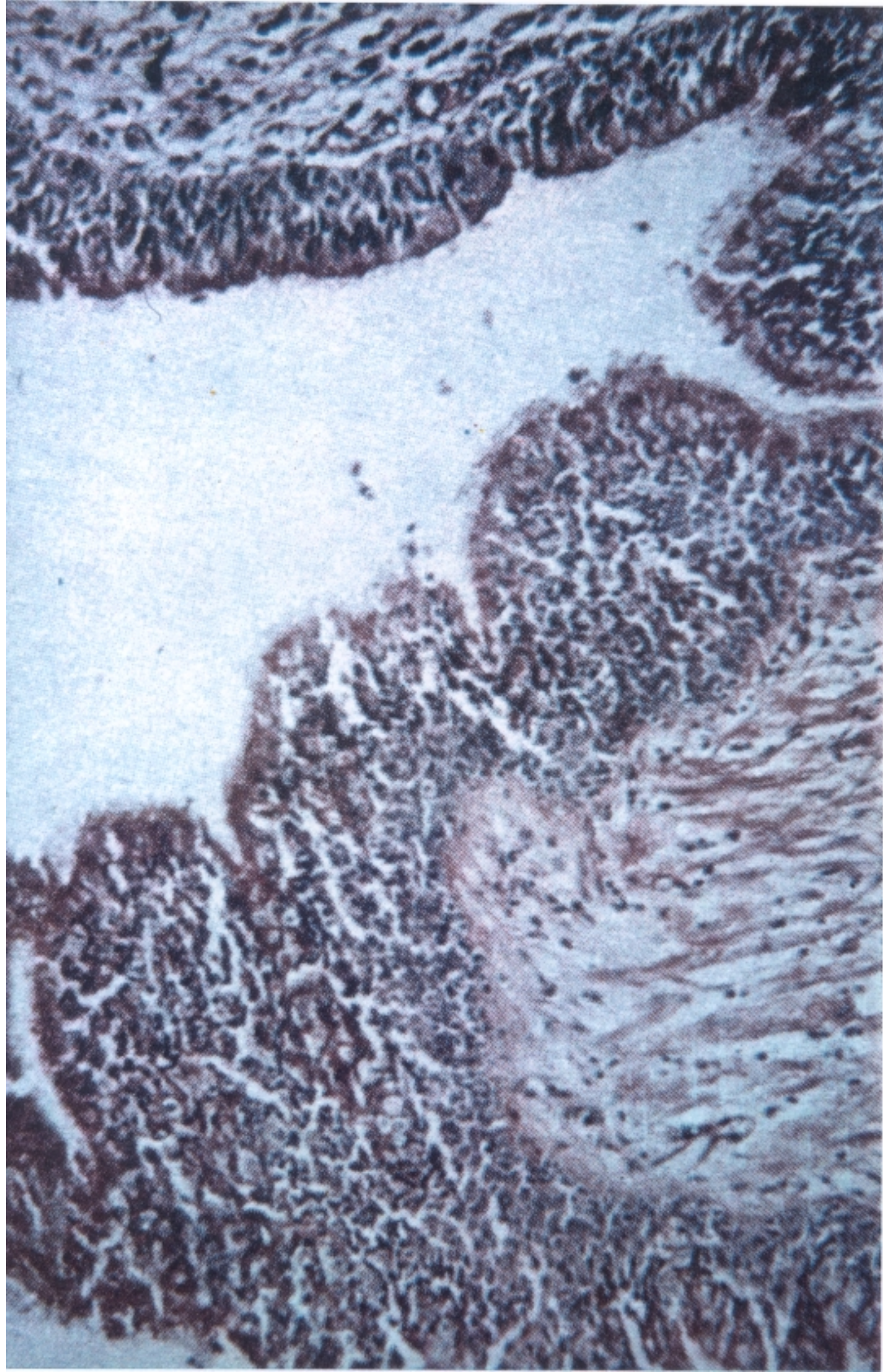
Las glándulas de la pared bronquial están aumentadas en número con sus conductos excretores dilatados. La relación entre el tamaño de las glándulas mucosas y el espesor de la pared bronquial, "*índice de Reid*", se encuentra por en cima de los valores normales (0.14-0.36)¹⁷¹.

El tejido submucoso muestra un cierto edema e infiltración de células inflamatorias.(Fig.11)

La membrana basal, que separa este tejido del epitelio, esta engrosada por el depósito de polisacáridos.

La cronificación del proceso inflamatorio conduce a la afectación de los estratos más profundos de la pared bronquial originando una atrofia local de la musculatura mural, que es sustituida por tejido rico en fibras colágenas.

FIGURA 11.- Bronquitis Crónica: Anatomía Patológica.



Ya en las fases más avanzadas de la enfermedad las lesiones no se limitan sólo a los bronquios, sino que afectan al parénquima pulmonar y a los vasos pudiendo aparecer lesiones secundarias a la hipertensión pulmonar la cual puede conducir a cuadros de Cor Pulmonale Crónico¹⁷².

3.3.2. - MODIFICACIONES DE LA SECRECIÓN BRONQUIAL EN LA E.P.O.C.-BRONQUITIS CRÓNICA

La flogosis crónica de la mucosa bronquial determina varias e importantes modificaciones en la secreción bronquial.

Desde el punto de vista cuantitativo, la vasodilatación y el edema en la mucosa al determinar mayor aporte de agua al *aparato mucosecretor*, condiciona un aumento del volumen de las secreciones por simple hidratación de las mucoproteínas bronquiales.

Igualmente el estímulo irritativo sobre las células caliciformes y las glándulas tubuloacinosas se traduce en más rápidos ritmos de síntesis de secreción bronquial.

Todo ello se manifiesta en un aumento sobre la cantidad normal de secreción bronquial que el sujeto produce al día¹.

A nivel cualitativo, las más evidentes y conocidas modificaciones se producen en las proteínas plasmáticas que como ya se dijo anteriormente difunden hacia las secreciones por transudación pasiva, dependiente de la vasodilatación y del edema. En los sujetos con bronquitis crónica existe junto al aumento en la producción antes mencionado, un incremento muy notable de la difusión de sustancias proteicas desde el plasma.

De este modo se acusa una verdadera pérdida de proteínas con la expectoración¹⁷³. Gracias al estudio de los radiisótopos¹⁷⁴ se han obtenido resultados precisos sobre la entidad de la pérdida proteica con la expectoración, mediante el cálculo del *turnover* de la albúmina en sujetos sanos y en bronquíticos crónicos; y de la eliminación por vía bronquial, del material proteico de proveniencia hemática como la albúmina marcada con I-131¹⁷⁵.

En todos estos estudios se demostró que la pérdida de proteínas por la expectoración no solo afectaba a la albúmina y a las globulinas alfa ó beta, sino también a las inmunoglobulinas de las tres clases mayores (IgA, IGM, IgG).

Los estudios de Brogan et al¹⁷⁶, en sujetos bronquíticos con insuficiencia cardiaca derecha demostraron un incremento en el contenido de proteínas totales respecto de los sujetos que

siendo bronquíticos carecían de fallo cardiaco derecho, obteniendo unos valores de 928 ± 46 mg/100ml y 597 ± 228 mg/100ml, respectivamente.

Este dato parece reflejar un mayor paso de proteínas en los sujetos con fallo cardiaco seguramente debido al denominado fenómeno de "*interdependencia ventricular*"¹⁷⁷, que aumenta aún más la presión en el árbol vascular pulmonar facilitando la salida de proteínas a la secreción bronquial.

Perezagua et al.¹⁷⁸, analizaron la fracción proteica de 16 sujetos afectados de bronquitis crónica y la compararon con la de sujetos controles sanos, obteniendo unos resultados en los que se demostraba que algunas proteínas, que aparecían en muy escasa cantidad en los sujetos control, *haptoglobina*, *ceruloplasmina*, etc..., lo hacían de forma más evidente en los bronquíticos crónicos.

Por lo que respecta a los otros componentes de la secreción bronquial podemos decir brevemente que; en los sujetos afectados de bronquitis crónica se produce un defecto de alfa-1-antitripsina⁴⁴, y un importante aumento de la *láctico deshidrogenasa* (LDH) sobretodo de sus isoenzimas 4 y 5.

En cuanto al DNA se produce un aumento en los casos de flogosis crónica, debido seguramente a la destrucción de células epiteliales bronquiales como consecuencia de los procesos inflamatorios⁴⁰.

En lo referente a las modificaciones en las enzimas responsables de la síntesis de las mucoproteínas bronquiales, *glicosidasas, transferasas*, etc..., se hallan en proporciones variables en función de la preferencia en la síntesis y excreción de las diferentes clases de mucinas que se producen en la flogosis crónica³⁷.

Ha sido descrito un ritmo circadiano de variación en la concentración de las glucoproteínas y otras macromoléculas en las secreciones de los bronquíticos crónicos, es muy probable que este patrón sea también característico del sujeto normal¹⁰.

Por lo que se refiere a los electrolitos también parece existir variaciones en orden creciente en los sujetos afectados de bronquitis crónica respecto a los sujetos normales³⁹.

3.3.3.- DIAGNOSTICO PRECOZ DE LA BRONQUITIS CRONICA

La mortalidad de los pacientes con bronquitis crónica supera a la teórica para varones de la misma edad. Las tasas de mortalidad son cuatro veces mayores en ellos, por eso en los últimos años se ha prestado un interés especial a la predicción de la enfermedad obstructiva de la vía aérea, partiendo de un pequeño número de datos característicos fáciles de determinar¹⁷⁹ .

Han aparecido numerosos modelos distintos según los factores de riesgo incluidos, basados en el estudio Tecumseh¹⁷⁹. Este es un estudio longitudinal efectuado sobre enfermedades respiratorias en Tecumseh (Michigan) con el objeto de averiguar qué proporción de la población va a presentar al cabo de 10-15 años una enfermedad obstructiva de las vías aéreas.

Entre los factores incluidos en el modelo del estudio están la edad, el sexo, el nivel de volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV_1), el número de cigarrillos consumidos diariamente, y si el hábito de fumar persiste, cambia o se interrumpe por completo durante los 10-15 años de seguimiento que dura el estudio.

Para facilitar la utilización clínica del modelo se ha desarrollado un sistema de puntuación en el que se adjudican distintas cifras para cada factor de riesgo y se calcula al final la suma total. (Tabla VIII)

Esta cifra representa una estimación del riesgo particular del paciente para presentar una enfermedad obstructiva de las vías aéreas a los 10-15 años.

A dicho estudio se le podría añadir una vez estandarizada, la tasa de IgA en moco bronquial, como factor tanto predictivo como pronóstico en la evolución de los cuadros de E.P.O.C.

TABLA VIII
Indice de riesgo para E.P.O.C. (Tecumseh)

				VARONES		Cambio nº	Riesgo de EOVA*		
Edad	Ptos	Cig/día	Ptos	FEV1%	Ptos	Cig/día	Ptos	Total	Riesgo casos%
25	0	0	0	121	-14	-60	-9	<7	bajo riesgo
27	1	10	2	118	-12	-50	-7	8-14	1
29	2	20	5	115	-10	-40	-6	8-17	2
31	3	30	7	112	-8	-30	-4	8-19	3
33	4	40	9	109	-6	-20	-3	20	4
35	5	50	11	106	-4	-10	-1	21	5
37	6	60	13	103	-2	0	0	22	6
39	7			100	0	10	1	23	7
41	8			97	2	20	3	24	8
43	9			94	4	30	4	25	9
45	10			91	6	49	6	26	11
47	11			88	8	50	7	27	13
49	12			85	10	60	9	28	15
51	13			82	12			29	18
53	14			79	14			30	20
55	15			76	16			31	23
57	16			73	18			>32	alto riesgo
59	17			70	20				
61	18								
63	19								
65	20								
MUJERES									
25	0	0	0	121	-16	-60	-17	<10	bajo riesgo
27	1	10	4	118	-14	-50	-14	11-17	1
29	2	20	9	115	-11	-40	-11	18-20	2
31	3	30	13	112	-9	-30	-8	21-23	3
33	4	40	18	109	-7	-20	-6	24	4
35	5	50	22	106	-5	-10	-3	25	5
37	6	60	27	103	-2	0	0	26	6
39	7			100	0	10	3	27	7
41	8			97	2	20	6	28	8
43	9			94	5	30	8	29	9
45	10			91	7	49	11	30	10
47	11			88	9	50	14	31	11
49	12			85	11	60	17	32	13
51	13			82	14			33	14
53	14			79	16			34	17
55	15			76	18			35	19
57	16			73	21			36	21
59	17			70	23			>37	alto riesgo
61	18								
63	19								
65	20								

3.4. - CANCER DE PULMON

Las neoplasias del pulmón pueden ser primarias, que a su vez se clasifican en benignas o malignas y secundarias o metastásicas.

Los tumores benignos primarios representan menos del 5% de todos los tumores del pulmón y pueden tener un origen tanto epitelial como mesenquimatoso.

Las neoplasias epiteliales benignas más frecuentes son los papilomas que se presentan bajo forma única o múltiple¹⁸⁰ y de los cuales se sospecha que tengan una etiología viral.

Las neoplasias mesenquimatosas benignas poseen las mismas características histológicas que las de cualquier otra localización y suelen ser fibromas, lipomas, histiocitomas, leiomiomas, hemangioma esclerosante, granulomas de células plasmáticas y condromas. Estos últimos suelen presentarse bajo la forma de hamartoma condroide pulmonar, que es considerado como malformación pulmonar más que como un auténtico tumor pulmonar¹⁸¹ y son unas de las neoplasias mesenquimatosas más frecuentes.

Así mismo pueden aparecer tumores benignos de origen nervioso como schwannomas, neurofibromas y paragangliomas.

Los tumores primarios malignos son en su gran mayoría de origen epitelial y sólo un pequeño número tienen un origen mesenquimatoso. Por lo que se refiere a estos últimos son muy raros y en su diagnostico siempre se descartará un origen metastásico o un tumor epitelial primitivo que simule un crecimiento sarcomatoso.

Los tipos histológicos más frecuentes son los carcinomas, aunque los sarcomas sean los tumores que más a menudo metastatizan en el pulmón. Los carcinomas de útero, riñón y testículo suelen metastatizar por vía hematógena, y los de mama y abdomen lo suelen hacer por vía linfática, afectando con frecuencia primero los ganglios del hilio y extendiéndose, después, al pulmón.

La mayoría de los tumores epiteliales malignos nacen del epitelio bronquial, por lo que se denominan carcinomas broncogénicos. Debido a que estas neoplasias representan el 95% de todos los tumores pulmonares, el término carcinoma broncogénico se ha hecho sinónimo de carcinoma o simplemente cáncer de pulmón.

3.4.1.- CARCINOMA PULMONAR

En las encuestas realizadas en 1987 se estimó que hubo aproximadamente 150.000 nuevos casos de cáncer de pulmón y alrededor de 136.000 muertes por esta enfermedad en los Estados Unidos. En España la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón se sitúa alrededor del 35 por 100.000 habitantes¹⁸³.

Además y a diferencia de otros cánceres, la incidencia se incrementa rápidamente en ambos sexos, tanto entre fumadores como no fumadores. En nuestro país la incidencia por sexos es de una mujer por cada 15 hombres aunque insistimos dicha relación va en disminución¹⁸³.

Por lo que se refiere al estrato de edades, la máxima incidencia del cáncer de pulmón se da entre los 60-70 años, con un pico a los 60 años, disminuyendo luego paulatinamente y siendo raro que se presente antes de los 40 años¹⁸³.

A) Etiología

La etiología y patogenia del carcinoma pulmonar participa de los mismos problemas que la oncología general, sus causas son multifactoriales. Existen evidencias en relación por ejemplo con el hábito de fumar cigarrillos, aunque no está claro si actúa como causa única o sinérgicamente con otras.

Realmente se conoce poco sobre la etiología última del cáncer de pulmón, sin embargo por hechos indirectos y datos estadísticos se sugiere fuertemente que sustancias inhaladas durante largos periodos de tiempo son causas muy importantes.

1.- Tabaco

La relación entre cáncer de pulmón y tabaco es un hecho incontrovertible desde que en 1950, Wynder y Graham¹⁸⁴ publicaron un estudio epidemiológico de 684 casos de carcinoma de pulmón. Los análisis estadísticos apoyan la existencia de una relación directa entre el cáncer de pulmón y el número de cigarrillos consumidos, así como la duración en el hábito de fumar. Se estima que los fumadores tienen un riesgo diez veces mayor de contraer un carcinoma broncogénico que los no fumadores, aumentando este riesgo al doble cuando se consumen 20 o más cigarrillos al día.

Por lo que se refiere a los factores cancerígenos demostrados en el tabaco podemos decir, que el humo del tabaco contiene una mezcla muy compleja de componentes químicos como son productos celulósicos, alquitrán, proteínas, alcaloides, etc...; específica del tabaco y no de otros humos es la nicotina que no contiene cualidades cancerígenas y isoprenoides que tampoco las presentan. Las acciones cancerígenas corresponden básicamente a los hidrocarburos aromáticos y en menor grado a los fenoles, que se encuentran formando parte del alquitrán.

Dentro de estos hidrocarburos con acción carcinogénica tenemos¹⁸⁵ los benzopirenos, el dibenzoantraceno, el benzofenantreno, etc...

Se sabe que algunos de estos hidrocarburos policíclicos aromáticos, tales como el benzopireno y el dibenzantraceno, son capaces, a través de sus metabolitos activos producidos tras la acción del enzima *aril-hidrocarbónhidroxilasa*, de reaccionar con la membrana de la célula epitelial y de introducirse en el núcleo de la célula uniendose a su DNA y alterando todo el metabolismo celular y la estructura de la membrana facilitando con ellos los cambios histológicos necesarios para la transformación maligna de la célula epitelial de la mucosa bronquial.

Estos cambios histopatológicos en esquema son: la aparición de fenómenos de hiperplasia de las células basales en dos o más estratos; cambios metaplasicos consistentes en la transformación del epitelio ciliado columnar de la mucosa bronquial, en células planas sin cilios; cambios displásicos de dichas células y la aparición última de carcinoma in situ¹⁸³.

2.- Otros agentes etiológicos

Junto al tabaco existe una gran cantidad de agentes que de una u otra forma parecen estar relacionados con la etiología del carcinoma pulmonar, así por ejemplo existen fundadas sospechas de que en algunos sujetos con genotipos susceptibles con el paso de los años, se producen las situaciones ideales para que los carcinógenos ambientales desarrollen el cáncer de pulmón.

Aunque todos los datos existentes en este sentido son meramente circunstanciales sí es probable que exista una predisposición a la herencia del cáncer, en este sentido algunos autores¹⁸⁶ han demostrado el mayor riesgo en los sujetos afectos de E.P.O.C. de desarrollar un carcinoma de pulmón en los años siguientes al diagnostico de su enfermedad de base; otro dato en favor del posible carácter hereditario del cáncer de pulmón lo tenemos en los estudios¹⁸⁷ que han

demostrado a alta frecuencia de parientes con cáncer de pulmón en sujetos fumadores afectados de dicho carcinoma.

Un último dato en favor de la intervención genética en este tipo de tumores, lo tenemos en la anormal distribución del alelo *c-Ha-ras* en los carcinomas de células no pequeñas, lo cual induce a pensar en fenómenos de desdoblamiento en el cromosoma 11p en este tipo de cancer¹⁸⁷.

Junto al tabaco y los posibles factores genéticos, existe todavía otra gran cantidad de factores que pueden intervenir de una u otra forma en la etiología del carcinoma pulmonar. Por ejemplo se sabe que la contaminación ambiental puede potenciar los efectos carcinogénicos del tabaco; los ambientes industriales en los que se trabaja con asbesto, arsénico, níquel, cromo, éteres clorometílicos, el gas mostaza, las radiaciones ionizantes, etc...¹⁸⁸

Por lo que se refiere al asbesto y las otras fibras industriales, podemos decir que la primera de ellas, el asbesto, tiene poca relación con el carcinoma pulmonar estando más relacionado con la aparición de mesoteliomas¹⁸⁹, de todas formas parece que la fibra de asbesto más relacionada con el carcinoma pulmonar es la *crocidolita*; algo parecido ocurre con el arsénico en el cual se sospecha que deban existir otros

cofactores que cooperen a la aparición de la neoplasia pulmonar¹⁹⁰.

En cuanto al níquel este término se ha atribuido a los mineros del cobre, quiénes pensaron que *Old Nick* era el responsable de sus gangas contaminadas. En realidad el agente agresor demostró ser el níquel mezclado con arsénico. El periodo de latencia entre la exposición al níquel y el desarrollo del carcinoma de pulmón es de unos 20 años y en oposición a los agentes anteriores, no parece que sea necesaria su asociación al consumo de cigarrillos para potenciar el desarrollo del cáncer de pulmón¹⁹¹. La variedad histológica de cáncer que suele ocasionar el níquel suele ser el carcinoma escamoso o epidermoide.

La exposición al cromo puede ocurrir en más de 100 tipos de profesiones, en general el periodo de latencia entre el inicio de la exposición y el carcinoma de pulmón es como media de 24 años, con un intervalo que oscila entre los 3-58 años. El tipo histológico suele ser el de células redondas, anaplásico e indiferenciado.

Aunque en general los éteres implican poco riesgo industrial una excepción importante la constituyen los éteres clorometílicos, agentes alquilantes que se observan en dos

formas: éter clorometílico (CME) y éter diclorometílico o bisclorometílico (BCME). Este último es el de mayor poder carcinogénico. El cáncer de pulmón que producen estas sustancias es de la variedad de células pequeñas¹⁹².

El gas mostaza o *bis[a-cloroetil]-sulfito* utilizado en la primera guerra mundial puede ocasionar, tal y como demostró Yamada en 1959 en los trabajadores de una fabrica¹⁹³ que en una isla japonesa habían fabricado este gas durante la segunda guerra mundial, carcinoma de pulmón sobretodo de la variedad escamosa.

Actualmente se sabe que el mayor peligro carcinogénico procedente de las radiaciones ionizantes radica en la inhalación de los productos de desintegración del *radón* y no de este elemento como tal¹⁹⁴. Entre dichos productos destaca el polinio-218 y el polonio-214, que una vez inhalados sobre las superficies de las partículas de polvo, se depositan en las mucosas de las vías aéreas produciendo a este nivel, una irradiación local y acumulativa alterando la estructura y función normal de las células de dicha mucosa. Desde el punto de vista histológico, la variedad más frecuente en el cáncer de pulmón inducido por las radiaciones ionizantes es el de células pequeñas.

Por último no podemos terminar los factores etiológicos del carcinoma pulmonar sin al menos mencionar, por un lado, el efecto que sobre el desarrollo de dichas tumoraciones tiene la variabilidad geográfica, no olvidemos que el cáncer es más frecuente en las zonas urbanas que en las rurales¹⁹⁵; y por otro la mayor incidencia de neoplasias pulmonares en los sujetos con cicatrices, tuberculosis, neumoconiosis y traumatismos pulmonares, que dan lugar al denominado *scar-cáncer*.

B) Anatomía Patológica

Embriológicamente, todas las células del árbol bronquial derivan de un tubo endodérmico primitivo¹⁹⁶. Los carcinomas de pulmón pueden mostrar uno o todos los elementos que posteriormente conformarán la mucosa bronquial y sus glándulas.

En 1966¹⁹⁶ se sugirió la hipótesis de que los tumores y las células "endocrinas" tenían su origen en la cresta neural. Esta idea se ha abandonado debido a diversos estudios morfológicos, experimentales, ultraestructurales y epidemiológicos.

Actualmente la mayoría de los autores apoyan el origen endodérmico local de las células pulmonares endocrinas o *células de Kulchitsky* que en el pulmón adulto constituyen menos

del 1% de todas las células epiteliales de los bronquios. La misma procedencia tienen todos los tumores pulmonares que contienen gránulos densos y elaboran péptidos y aminos.

En la tabla IX se especifica la clasificación de los tumores pulmonares malignos epiteliales en base a la segunda edición de The Histological of Lungs Tumours de la O.M.S.

Los datos sobre la incidencia del carcinoma de pulmón según la histología son difíciles de conseguir debido al sesgo inherente tanto a la procedencia como al tipo de material diagnóstico disponible. Así cuando el material diagnóstico procede casi enteramente de la biopsia bronquial o de la citología, existirá un gran número de carcinomas escamosos y de células pequeñas, puesto que estos tumores se localizan en la parte proximal del árbol bronquial. Si los datos proceden de pacientes operados, se observarán también un número elevado de carcinomas escamosos en relación con el resto de tipos histológicos, ya que estos enfermos representan los candidatos más habituales a la resección curativa.

En cambio los estudios autópsicos, favorecen más a los tumores agresivos y sintomáticos que producen el fallecimiento del paciente mientras aún está ingresado. Pese a todas estas consideraciones los carcinomas epiteliales que con mayor

frecuencia aparecen en la clínica son¹⁹⁷; el carcinoma escamoso o epidermoide(35-60%), el adenocarcinoma(20-30%), el carcinoma de células pequeñas(20-28%) y el carcinoma de células grandes (7-15%).

1.- Carcinoma Escamoso o Epidermoide (fig.12)

Para conseguir una nomenclatura más homogénea se prefiere el término de carcinoma *Escamoso* al de *Epidermoide*, ya que muchas veces estos tumores no producen queratina visible al microscopio óptico. En sentido amplio todos los carcinomas son escamosos puesto que son de tipo epitelial, tienen un citoesqueleto formado por queratina y reaccionan frente a anticuerpos antiqueratina.

En realidad, la diferenciación entre los dos términos es de tipo cuantitativo; así, el término *célula escamosa* es más apropiado si los elementos celulares producen gran número de tonofibrillas unidas a desmosomas firmes y bien formados, de modo que sea posible observar mediante microscopia óptica convencional uniones intercelulares en corte de 5 μ m de grosor teñidos con hematoxilina-eosina.

TABLA IX

**Nomenclatura de los tumores pulmonares
malignos epiteliales.
(O.M.S.)**

1.Carcinoma escamoso [carcinoma epidermoide]	8070/3*
a.Carcinoma fusocelular [carcinoma escamoso de células fusiformes]	8074/3
2.Carcinoma de células pequeñas	3041/3
a.Carcinoma de células grano de avena "Oat cell"	8042/3
b.Carcinoma de células en grano de avena tipo intermedio	8043/3
c.Carcinoma de células en grano de avena tipo combinado	
3.Adenocarcinoma	8140/3
a.Adenocarcinoma acinar	8550/3
b.Adenocarcinoma papilar	8260/3
c.Adenocarcinoma bronquioloalveolar	8250/3
d.Carcinoma sólido con transformación de moco	8230/3
4.Carcinoma de células grandes	8012/3
a.Carcinoma de células gigantes	8031/3
b.Carcinoma de células claras	8310/3
5.Carcinoma Adenoescamoso	8560/3
6.Tumor carcinoide	8240/3

* Los números representan los códigos de ICD-O y SNOMED

Los tumores que presentan queratinización y uniones intercelulares reciben el nombre de *carcinomas escamosos bien diferenciados*, en cambio aquellos que requieren ser examinados con mayor aumento para encontrar características escamosas, se conocen como "mal diferenciados o indiferenciados". Por definición un carcinoma escamoso totalmente indiferenciado es un carcinoma de células grandes.

Características biológicas

Los carcinomas escamosos bien diferenciados, se caracterizan por formar islotes de células tumorales rodeados de fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y a menudo también por eosinófilos y células epiteloides gigantes, a veces parecen estar totalmente incluidos en el colágeno.

Otra característica de los carcinomas escamosos o epidermoides es la invasión por neutrófilos de los centros queratinizados de nidos de células tumorales. Igual que si se tratara de focos tuberculosos este material se vierte hacia los bronquios y origina cavidades de gran tamaño que crecen al mismo ritmo que el tumor.

Por lo que se refiere a su comportamiento metastásico, un estudio¹⁹⁸ sobre 200 carcinomas bien diferenciados demostró que las metástasis ocurrían en los mismos órganos que en el caso de otros tumores pulmonares, aunque con una frecuencia algo inferior; hígado (30%); suprarrenales (18%); SNC (10%) y páncreas (5%). En más del 50% los tumores eran intratorácicos.

Al igual que todos los demás tumores pulmonares es capaz de producir ACTH, lo que explicaría la asociación de dicho tumor a los cuadros de hipercalcemia¹⁹⁹.

2.- Adenocarcinoma (fig.13)

Son carcinomas de células grandes que han desarrollado sus características secretoras inherentes y que además, muestran gran tendencia a tapizar los espacios aéreos. Su producto secretor más evidente es la *mucina*.

Los tumores bien diferenciados forman túbulos imperfectos, ácinos y estructuras papilares que protuyen en los espacios tapizados por células tumorales.

La O.M.S. identifica cuatro variedades: el *adenocarcinoma acinar*, el *papilar*, el *bronquioloalveolar* y el *carcinoma sólido con formación de moco*. Los tipos acinar y papilar se observan a

menudo combinados y se identifican por el predominio de uno u otro tipo histológico. En cambio, el diagnóstico del carcinoma sólido exige la demostración de gránulos de mucina en cantidad apreciable.

El cuarto tipo, el carcinoma bronquioloalveolar, es un tumor papilar periférico que se identifica por las siguientes características: las células tumorales tienen un aspecto relativamente benigno, se distribuyen a lo largo de las paredes alveolares preexistentes y tienden a apilarse formando pequeños penachos; además las células tumorales no invaden el estroma y se identifican elementos celulares originados en las vías aéreas periféricas o en los alvéolos (células claras, neumocitos de tipo II o una combinación de ambos).

Características biológicas

El adenocarcinoma es el principal tipo de cáncer de pulmón que se asocia a osteoartropatía pulmonar hipertrófica²⁰⁰.

Aunque las lesiones de dicha artropatía comparten algunas afinidades con las de la acromegalia y se han informado²⁰⁰ en estos casos, aumentos de los niveles sanguíneos de la hormona del crecimiento, aunque no hay pruebas definitivas de que esta hormona sea la responsable última de la osteoartropatía.

Si bien la hormona del crecimiento humana es la que más se asocia al adenocarcinoma de pulmón, estos tumores también pueden producir otras hormonas como la ACTH ya mencionada, la calcitonina, foliculoestimulante y gonadotropinas. Se han descrito²⁰¹ algunos casos de adenocarcinomas individuales productores de múltiples marcadores neuroendocrinos.

En lo referente a las metástasis, aproximadamente el 60%²⁰² de los tumores que se presentan como lesiones numulares o "en moneda" corresponden a adenocarcinomas. Los tumores se diseminan de forma difusa, pero marcan cierta preferencia a localizarse en el SNC; en algunos estudios se ha demostrado esta localización en más del 50% de los casos estudiados²⁰².

Por último en los que concierne a los adenocarcinomas debemos indicar que existen algunos adenocarcinomas papilares periféricos que se irradian mediante tabiques alveolares a partir de una zona central formada en general, por una cicatriz densamente hiperpigmentada, recibiendo en este caso la denominación de Scar-cáncer o cáncer-cicatriz²⁰³.

Se ha discutido durante muchos años si la cicatriz es la causa o el resultado final del tumor. Algunas teorías²⁰³ afirman que la cicatriz actúa como una "trampa" para atrapar carcinógenos; estas ideas se han discutido por varios

motivos²⁰³ basandose casi todos ellos en que el colágeno de estos carcinomas es más característico del de un producto tumoral que del de una cicatriz.

Por el contrario, otras observaciones²⁰³ favorecen la hipótesis de que el scar-cáncer se origina en una cicatriz; así el adenocarcinoma es el principal tumor observado en los pulmones fibróticos de los pacientes con esclerosis sistémica progresiva y como en los márgenes de las lesiones tuberculosas antiguas. Finalmente los rasgos de crecimiento de estos tumores son muy distintos a los de los carcinomas escamosos; mientras en los primeros la localización de la cicatriz es central, en los segundos hay tejido fibroso rodeado nidos de células tumorales entre sí.

Lo más probable es que ambas teorías sean correctas, es decir, que algunos adenocarcinomas periféricos tengan su origen en una cicatriz, mientras que en otros el tumor produzca secundariamente tejido cicatrizal.

3.- Carcinoma de células pequeñas (fig.14)

Es uno de los carcinomas de pulmón a los que se le presta más atención en la literatura especializada debido a sus características neuroendocrinas y su falta de respuesta a la

radioterapia y quimioterapia. Puesto que su frecuencia de metástasis es muy alta, algunos oncólogo²⁰⁴ no consideran a esta neoplasia tributaria de cirugía.

Sin embargo Shields²⁰⁵ ha aportado datos contradictorios al respecto, pues informó sobre una tasa de supervivencia a los 5 años del 23 % en pacientes con carcinoma de células pequeñas y a los que no se administró quimioterapia.

Aunque de modo característico los carcinomas de células pequeñas afectan a los bronquios mayores y segmentarios, pueden observarse en cualquier región del pulmón e incluso a nivel subpleural. Antiguamente se les denominaba *sarcomas de células en grano de avena o sarcomas tipo oat cell* (afín a los linfomas), pues a menudo las lesiones metastásicas en los ganglios linfáticos regionales eran mucho más prominentes que la propia lesión pulmonar.

Estos tumores se aceptaron como carcinomas de pulmón tras la demostración por Barnard²⁰⁶ de que mostraban transiciones a otros tipos de neoplasias pulmonares. Sin embargo se conservó el prefijo "oat cell" en razón a su estructura ovoide y su escaso poder cohesivo.

En este tipo de tumor la citología del esputo es característica; las células tumorales tienden a disponerse en hilera o en "fila india" tienen, en general, un tamaño de 15-20 um, están formadas casi enteramente por un núcleo enorme, poseen una cromatina fina y dispersa y muestran nucléolos muy poco evidentes o incluso ausentes. Presentan así mismo fenómenos de "moldeado nuclear" debido a la indentación de un núcleo por una célula vecina.

Puesto que a menudo hay una metaplasia escamosa de células superficiales sobre células verdaderamente tumorales, en una biopsia bronquial de esta neoplasia pueden observarse tanto células escamosas como células propias del carcinoma. Estas últimas son con frecuencia aplastadas por el broncoscopio fenómeno éste tan constante que algunos patólogos²⁰⁷ lo han denominado *signo del aplastamiento celular* y lo consideran un signo diagnóstico del carcinoma de células pequeñas.

Un rasgo distintivo del carcinoma de células pequeñas clásico u "oat cell", es que no produce una respuesta celular apreciable en el huésped, como la que ocurre en el adenocarcinoma y en los carcinomas escamosos.

Estos carcinomas presentan una elevada tasa mitótica y frecuente necrosis.

El DNA liberado impregna las paredes de los vasos sanguíneos adyacentes y les confiere un perfil grueso oscuro, lo cual ayuda a su diagnóstico aunque este no es un signo patognomónico.

Siguiendo la clasificación de la OMS aparte del carcinoma de células "clásicas", a menudo se observan células más grandes e irregulares que contienen núcleos tipo *células pequeñas*. Antes estos elementos recibían el nombre de células poligonales pequeñas pero, en la actualidad de acuerdo con la clasificación de la OMS, se las conoce como células de la *variedad intermedia*, junto a este tipo coexiste otro de células pequeñas de tipo combinado, en el que se mezclan ambas formas de celularidad.

Características biológicas

Los tumores de células pequeñas son muy bien conocidos por la gran cantidad de polipéptidos y aminos que pueden secretar.

En 1928 se describió el primer caso clínico de una mujer diabética barbuda. Diez años después¹⁹⁹ se describieron hiponatremias y natriuresis, atribuidas posteriormente a la secreción inadecuada de hormona antidiurética.

Basandose en 37 pacientes con aumento de los niveles plasmáticos de la ACTH, Liddle acuñó en 1965, el término síndrome de la producción ectópica de ACTH. En 1974, Gewirtz y Yalow²⁰⁸ demostraron que distintos tipos de carcinoma de pulmón producían la "ACTH mayor", una molécula inactiva de peso molecular relativamente grande, a partir de la cual se originaban por división la ACTH hipofisaria activa, de peso molecular menor.

Más adelante Yesner y Yalow¹⁹⁷ demostraron que, como término medio la cantidad de hormona producida guardaba relación con el grado de diferenciación del tumor y que el mayor productor era el carcinoma de células pequeñas.

Desde entonces se han descubierto toda clases de productos endocrinos y sus precursores en las secreciones de los carcinomas pulmonares; entre ellas destacan las siguientes: bombesina, calcitonina, ACTH, Leu-encefalina, gastrina, serotonina, somatostatina, hormona estimulante de los amelanocitos, péptido intestinal vasoactivo, glucagón, insulina, sustancia P, enolasa específica neuronal, compuesto S-100 y cromogranina¹⁹⁹.

Pese a la esencia definitivamente neural de algunos de estos productos, debemos volver a recordar que el carcinoma de

células pequeñas procede embriológicamente de células epiteliales que contienen filamentos de queratina y desmosomas.

Además la denominada *enolasa específica neuoronal*¹⁹⁹ no es en realidad específica de estas células puesto que puede ser secretada por cualquier tipo de cáncer de pulmón, si bien el que más lo hace es el de células pequeñas.

En lo que concierne a las metástasis del carcinoma de células pequeñas en un estudio de 200 carcinomas²⁰², se demostró que en más del 90% había metástasis extratorácicas. La distribución de dichas metástasis transcurridos varios años era la siguiente: hígado (65%), glándulas suprarrenales (58%), SNC (30%), páncreas (30%), hueso (28%) tracto genitourinario 20%, tiroides (10%), bazo (10%) y otros órganos menos del 10%.

4.- Carcinoma de células grandes

En la nomenclatura de la O.M.S., en el grupo de los adenocarcinomas se incluyó a los carcinomas de células grandes "sólidos" y con reacción positiva para la mucina (el llamado carcinoma sólido con formación de moco); probablemente ello contribuyó en gran medida al aumento observado desde entonces en el grupo de los adenocarcinomas²⁰⁹.

Las "células grandes" se identifican por sus núcleos vesiculares, sus nucleólos prominentes y por las zonas perinucleares más claras.

Se distinguen dos tipos principales: *de células gigantes y de células claras*. Los primeros se caracterizan por presentar células muy grandes, a veces pleomórficas y en ocasiones multinucleadas en las que no es infrecuente observar fenómenos de fagocitosis, tienden a ser tumores de localización periférica presentando frecuente infiltración por neutrófilos.

Los carcinomas de células claras presentan fenómenos de proliferación compacta de células grandes de núcleo único y citoplasma claro, estos carcinomas son de aparición rara y escasa²⁰⁹.

Características biológicas

Tienen un comportamiento biológico bastante parecido a los adenocarcinomas; tienden a ser tumores periféricos en los que existe infiltrado por polinucleares, a veces se descubre en sangre periférica una reacción leucemoide. Por estudios inmunoquímicos parece que son capaces de segregar glucógeno²⁰¹.

En lo referente a las metástasis²⁰² también se comportan como adenocarcinomas y en más del 50% de los casos producen metástasis cerebrales. La variedad de células gigantes (es decir, los carcinomas de células grandes con más del 40% de células gigantes) muestran un pronóstico particularmente malo y son pocos los pacientes que sobreviven al año.

FIGURA 12.- Adenocarcinoma

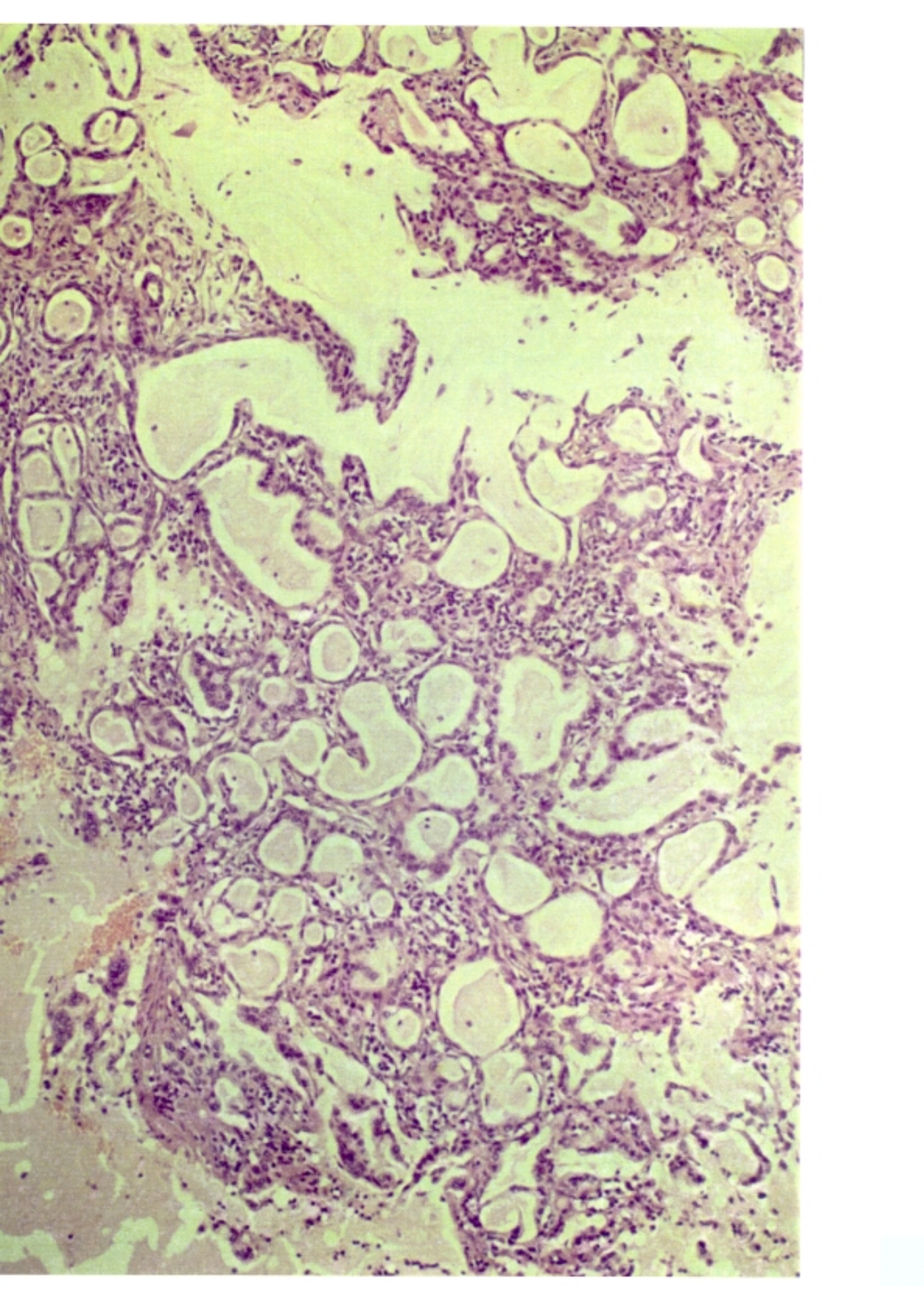


FIGURA 13.- Carcinoma Epidermoide

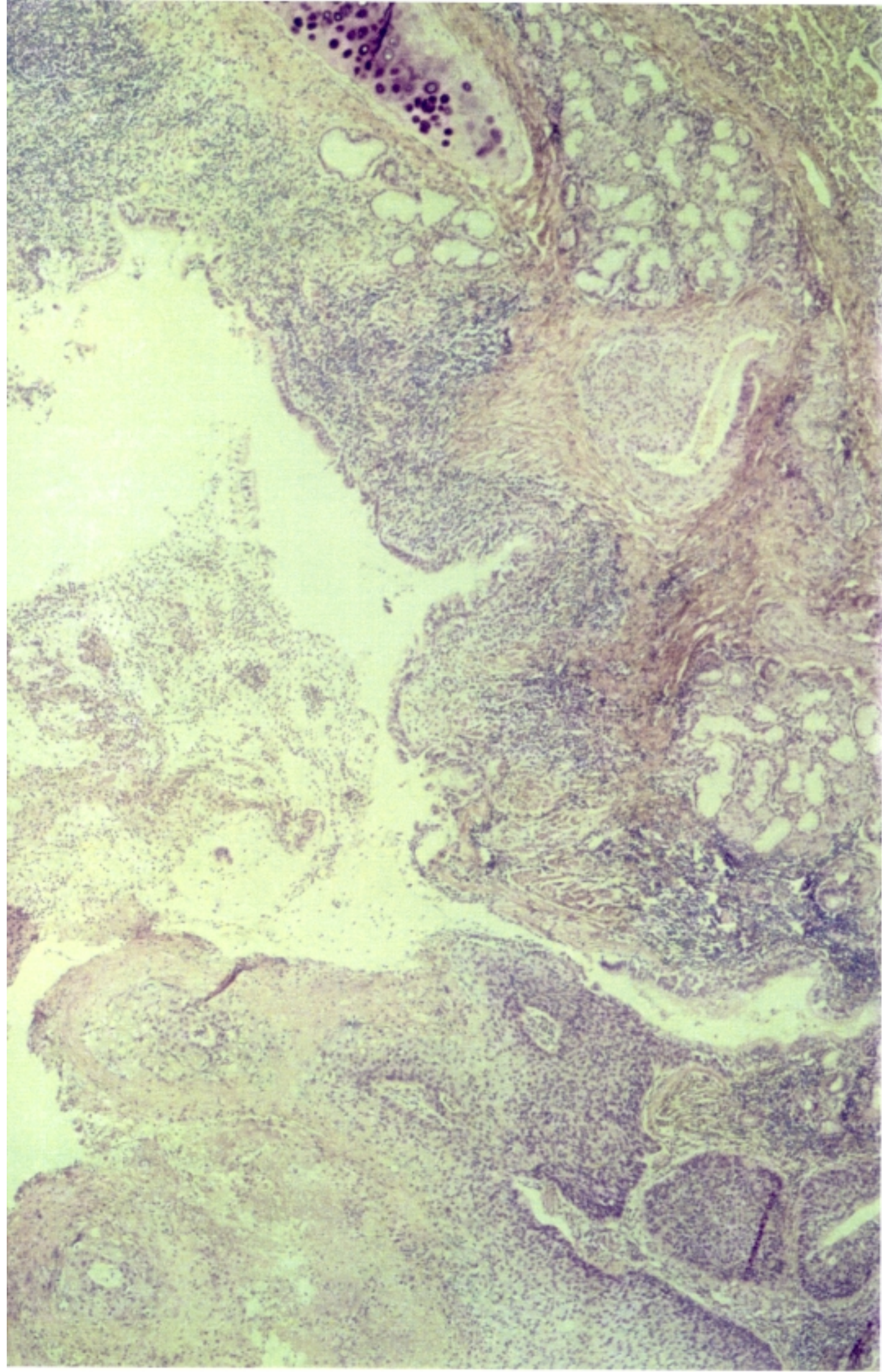
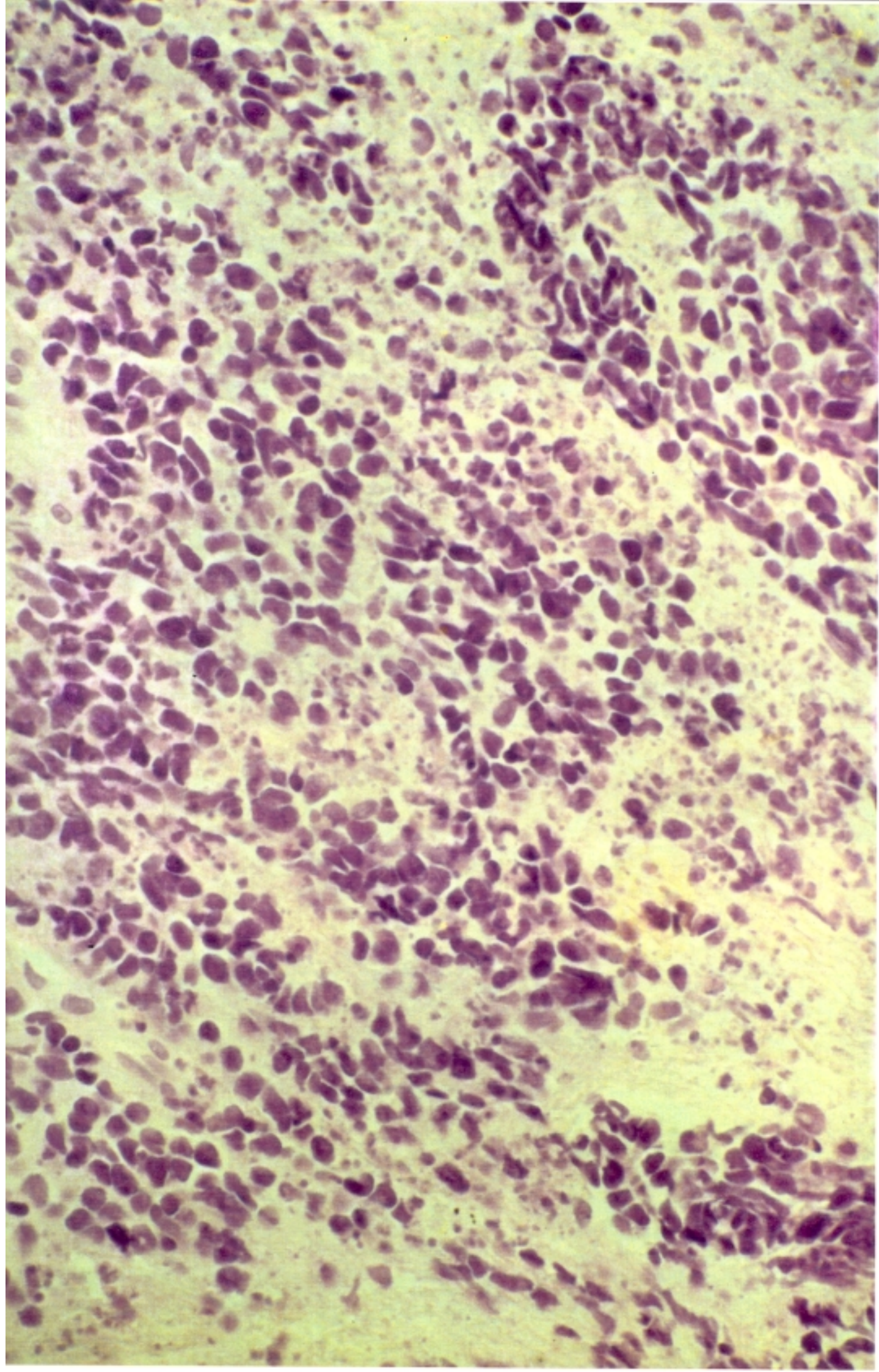


FIGURA 14.- Carcinoma de células pequeñas tipo "Oat
cell".



3.4.2. - MODIFICACIONES DE LA SECRECIÓN BRONQUIAL EN EL CARCINOMA PULMONAR

Dentro de las neoplasias pulmonares es el *adenocarcinoma bronquioloalveolar* el más representativo en cuanto a sus alteraciones de tipo mucoso. Esta neoplasia se localiza en las ramificaciones extremas de las vías aéreas, expresándose como una proliferación epitelial bronquiolar cuyo dato más característico es la hipersecreción bronquial acompañada generalmente de un cuadro de tos.

Esta hipersecreción tiene un carácter seromucoso y viscoso, muy rico en mucinas neutras o *fucomucinas* y pobre en *siálo* y *sulfomucinas*.

En términos generales en las neoplasias pulmonares se producen alteraciones a nivel del epitelio bronquial, algunas de las cuales son parecidas a las lesiones propias de la bronquitis crónica, tales como hiperplasia glandular, etc... que pueden modificar la composición de las secreciones producidas a este nivel tanto en cuantitativa como cualitativamente aunque, hoy por hoy no existe un patrón característico de secreción bronquial neoplásica, salvo el caso descrito anteriormente del *adenocarcinoma bronquioloalveolar*²¹⁰.

A pesar de ello sí es frecuente²¹¹ encontrar un aumento de las proteínas plasmáticas, como consecuencia de los fenómenos inflamatorios que rodean a las neoplasias bronquiales, así como un importante aumento en los ácidos nucleicos procedentes de las células destruidas en la proliferación tumoral²¹².

3.4.3 - DIAGNOSTICO PRECOZ DEL CARCINOMA DE PULMON

Hasta el momento actual sólo se dispone de dos procedimientos para la detección precoz del carcinoma de pulmón: la radiografía de tórax y el examen citológico del esputo. Desde el punto de vista conceptual la radiografía de tórax es el mejor procedimiento diagnóstico de *screening* del carcinoma de pulmón localizado (adenocarcinoma y carcinoma de células grandes)²¹³, mientras que la citología del esputo sirve como medio complementario de la radiología para detectar tumores pulmonares de localización central (carcinoma escamoso y de células pequeñas).

Estudios tempranos de *screening* realizados en la época de 1960 y principios de la siguiente, evaluaron ya la utilidad de la radiografía de tórax semestral en el diagnóstico precoz del carcinoma de pulmón. Así a los cinco años sobrevivía el 7-25% de los enfermos diagnosticados de este modo.

Más recientemente la *Johns Hopkins University*, la *Mayo Clinic*, y el *Memorial Sloan-Kettering Hospital*^{214,215,216} han aplicado la radiografía de tórax combinada con la citología del esputo en un estudio sobre el *screening* de estas neoplasias.

Los individuos objeto del estudio fueron varones mayores de 45 años que fumaban al menos un paquete diario, seleccionados al azar para practicarles unas radiografías de tórax estándar (en proyecciones posteroanteriores y laterales), junto con un examen citológico del esputo.

El estudio incluyó aproximadamente unos 30.000 sujetos, con la primera visita consiguieron detectarse 211 tumores, en un 73% de los casos solo con la radiografía de tórax. Como era de esperar desde el punto de vista histológico la mayoría eran carcinomas no pequeñas (ello era previsible, puesto que los pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas suelen presentar síntomas de modo más precoz, por lo que son excluidos automáticamente de los programas de *screening*)

En seguimiento posterior efectuado en los tres centros consiguió detectar aproximadamente 270 casos más de carcinoma de pulmón, al igual que anteriormente la mayoría se detectó solo mediante la radiografía de tórax. Por tipos histológicos

los casos se repartieron en partes casi iguales entre el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma.

Una perspectiva alentadora de este estudio es que el diagnostico se hizo mientras estaban aún asintomáticos y presentaban la enfermedad todavía en estadio I (Tabla X).

Como cabía esperar el carcinoma de células pequeñas se detectó más a menudo en la fase de seguimiento que al principio, puesto que la inclusión en un programa de *screening* eliminó, de entrada, el sesgo inicial que favorecía la selección de los tumores asintomáticos y de crecimiento más lento. Sin embargo pese al *screening* cuatrimestral, el carcinoma de células pequeñas no se diagnosticó precozmente: 25 de 27 pacientes seguidos en el *Memorial-Sloan Kettering Hospital* tenían ya enfermedad en estadio III. (Tabla XI)

Como puede deducirse de todo o dicho, la radiografía de tórax mostró mucha más sensibilidad que la citología del esputo en la detección precoz del carcinoma de pulmón; así, en la gran mayoría de los pacientes con radiografía de tórax anormal la citología del esputo ofreció resultados negativos.

Solo del 10-15% de los pacientes con un nuevo carcinoma de pulmón poseían células malignas en la citología como única evidencia de enfermedad.

En el diagnostico precoz del carcinoma de pulmón se ha utilizado el análisis de marcadores bioquímicos para la detección precoz así por ejemplo, recientemente mediante radioinmunoanálisis se han estudiado varios marcadores bioquímicos en la sangre de sujetos con cancer de pulmón localizado para comparar sus valores con los de los sujetos sanos.²¹⁷

Estas sustancias han sido la ferritina, el ácido siálico, la beta₂- microglobulina, lipoproteínas, las fracciones alfa y beta de la gonadotropina coriónica humana, la calcitonina y el antígeno carcinoembrionario. Desafortunadamente al conseguir especificidades del 95% el rango de sensibilidad era menor del 40%.²¹⁷

El antígeno carcinoembrionario (CEA) no es un indicador sensible en el *screening* del cáncer de pulmón, porque el 60% de 130 sujetos carcinoma pulmonar tenían valores normales (valores menores de 2.5 ng/ml).²¹⁸

Por ello creemos junto con otros autores^{219,220,221} que deben buscarse nuevos procedimientos de diagnostico precoz, que permitan mediante técnicas inócuas el diagnóstico precoz en sus primeros estadios del carcinoma de pulmón, como por ejemplo el estudio inmunológico de la IgA esputo.

TABLA X

Estadios del Carcinoma de Pulmón

Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	TS1	Carcinoma in situ	
Estadio I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Estadio II	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Estadio IIIa	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1-3	N2	M0
Estadio IIIb	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

TABLA XI

Clasificación TNM del cáncer de pulmón (ISS)*

TUMOR PRIMARIO (T)

- T0** No existe evidencia de tumor primario
TX Cáncer oculto, demostrado en la citología del LBA, pero no radiológicamente ni en fibroscopia.
TS1 Carcinoma in situ
T1 Tumor de ecm o menos de diámetro máximo, rodeado de pulmón o pleura visceral y sin evidencia en la broncoscopia de invasión proximal al bronquio lobar.
T2 Tumor de más de 3cm asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva, extendido a la región hiliar.
T3 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a las estructuras vecinas, tales como la pared torácica el diafragma o el mediastino y su contenido o tumor, situado a menos de 2cm de la carina o tumor asociado con neumonitis obstructiva, o atelectasia, o derrame pleural.
T4 Tumor de cualquier tamaño con infiltración del mediastino o del corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, carina, cuerpos vertebrales o con derrame pleural maligno.

GANGLIOS LINFATICOS REGIONALES (N)

- N0** Sin metástasis demostrables en los ganglios linfáticos.
N1 Metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales o hiliares ipsolaterales, o ambos, incluyendo la extensión directa.
N2 Metástasis en los ganglios mediastínicos o subcarínicos ipsolaterales.
N3 Metástasis en los ganglios mediastínicos o hiliares contralaterales, escalénico ipso o contralateral o supra claviculares.

METASTASIS A DISTANCIA (M)

- M0** Sin metástasis a distancia conocidas
M1 Metástasis a distancia presentes.

* Sistema Internacional para la determinación del Estadio.
desarrollado por el *American Joint Committe (AJC)*

3.5 - CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS

Uno de los principales retos a la ciencia médica moderna es la integración de los adelantos básicos de la inmunoquímica y la inmunobiología en procedimientos de diagnóstico, un claro ejemplo de ello es la utilización de las distintas técnicas existente para la determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas.

Históricamente la medición de las inmunoglobulinas se incluía como parte de las globulinas totales en el suero humano. La separación de las globulinas se llevaba a cabo por precipitación con sales u oro y la determinación cuantitativa, por el ensayo de biuret.

El conocimiento de la estructura de las inmunoglobulinas y la disponibilidad de anticuerpos contra cada clase de inmunoglobulinas es decir anticuerpos específicos para las regiones constantes de las cadenas pesadas, ha permitido la medición específica de cada inmunoglobulina.

Para la medición cuantitativa de éstas se han utilizado diversos sistemas inmunoquímicos, en parte la necesidad de contar con diversos procedimientos se debe a las grandes

diferencias de concentraciones entre las distintas clases de inmunoglobulinas. Por ejemplo existe una diferencia de un millón de veces en las concentraciones séricas de IgG e IgE.²²³

Son muchos los métodos de determinación cuantitativa de inmunoglobulinas existentes:

- . Inmunodifusión Radial (RID) con difusión limitada²²⁴ o con difusión cronometrada²²⁵.

- . Inmunoprecipitación nefelométrica cinética y de punto final.²²⁶

- . Electroinmunoanálisis, denominada también técnica "Rocket."²²⁷ o electroinmunodifusión de Laurell.

- . El ensayo inmunofluorométrico²²⁸.

- . Los sistemas turbidimétricos cinéticos²²⁹.

Estas técnicas no son válidas para la determinación cuantitativa de IgD y IgE, ya que los niveles de concentración de ambas inmunoglobulinas [IgD] (30 ug/ml) y [IgE] (2 a 2.000 ng/ml) son inferiores a las sensibilidades de los sistemas inmunoquímicos mencionados y salvo que existieran procesos

malignos monoclonales sus concentraciones no podrían ser detectadas, por lo que para la detección de ambas inmunoglobulinas se utilizan otros medios inmunoquímicos tales como RIA o el ELISA²³⁰.

Las pruebas por inmunodifusión radial simple consisten en unas placas con agar al cual se le ha incorporado el anticuerpo anti-Ig. Las muestras se colocan en cavidades formadas en el agar y difunden formando unos anillos de precipitación. El diámetro del anillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno, en este caso inmunoglobulina presente en la cavidad.

La determinación de inmunoglobulinas por nefelometría es una técnica de desarrollo más reciente. Mediante el nefelómetro se mide la dispersión de la luz producida por los complejos antígeno-anticuerpo formados en el tubo de ensayo.

La reacción antígeno-anticuerpo sigue la ley de acción de masas y en condiciones favorables²²⁶, la cantidad de complejos formados es función de las concentraciones de antígeno y de anticuerpo, en consecuencia la concentración del antígeno se puede determinar midiendo la cantidad de luz dispersa por los complejos en forma perpendicular al rayo incidente.

Los valores relativos de dispersión de la luz se transforman en unidades (mg/L o unidades internacionales) mediante un procesador de datos acoplado al instrumento.

Basicamente existen dos métodos de medición nefelométrica, *la de punto final* (método de Calbioricham-Behring, Hyland y J.T. Baker²²⁶, mide la dispersión de la luz formada por los complejos antígeno-anticuerpo después de llegar a un estado estacionario. *El método cinético* (Beckman y J.T. Baker) mide la velocidad máxima de aumento de la dispersión producida por la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

La técnica de Electroinmunoanálisis o técnica "Rocket", es un método rápido de cuantificación que requiere de 4 a 5 horas.

Laurell^{227,231} combinó las técnicas de inmunolectroforesis con la RID, logrando el equivalente de la difusión limitada en un tiempo mucho más reducido, mediante la migración del antígeno por electroforesis en gel de agarosa con anticuerpos en lugar del proceso lento de difusión.

Esta prueba esencialmente se basa, en que los anticuerpos no migran en gel durante la electroforesis, pero sí las moléculas del antígeno debido a las diferentes movilidades electrofóreticas. Al comienzo al migrar las moléculas de

antígeno, hay un exceso del mismo y los pequeños complejos solubles formados con las moléculas del anticuerpo, continúan desplazándose a pequeña velocidad en el gel que contiene el anticuerpo.

Según transcurre la electrofóresis, aumenta el tamaño de los complejos antígeno-anticuerpo y se produce la precipitación.

Dicho precipitado queda inmóvil mientras que el antígeno libre y los complejos de menor tamaño siguen avanzando hasta que todo el antígeno (o anticuerpo) se consume. En este punto se forma un "Rocket" (cohete) en punta que no se mueve, aún cuando la electrofóresis continúe.

El área o más comunmente la altura del "Rocket" se relaciona de forma directa con la concentración del antígeno mediante la formula:

$$\text{área} = K \times [\text{antígeno}] / [\text{anticuerpo}]$$

El sistema inmunofluorométrico más común para la determinación de IgG, IgM e IgA en el laboratorio clínico es el FIAX (International Diagnostic Technology, Santa Clara, C.A.).

En este procedimiento la muestra se incuba con exceso de anticuerpo monoespecífico preparado en cabra, marcado con

isotiacinato de fluoresceína anti IgG, IgM e IgA. La inmunoglobulina de la muestra compete por el anticuerpo marcado con una inmunoglobulina humana fijada a una fase sólida. Esta última consiste en IgG, IgM o IgA, inmunoadsorbida sobre la superficie polimérica de un palillo plástico de StiQ, el cual se sumerge en la mezcla de reacción muestra y anticuerpo.

El anticuerpo fluorescente restante, libre, reacciona con el antígeno unido al palillo plástico StiQ. La fluorescencia del anticuerpo fijado a dicho palillo se mide con un fluorómetro FIAX a 540 nm, luego de excitación a 475 nm. Esta fluorescencia está inversamente relacionada con la concentración de la inmunoglobulina en la muestra.

Las técnicas de análisis por turbidimetría, consisten en medir la disminución de la luz que pasa a través de una solución o suspensión de material turbio.

La muestra a analizar y el antisuero preparado se mezclan mediante una centrifugadora y la solución que contiene el precipitado antígeno-anticuerpo se hace pasar por una cubeta situada en el extremo del brazo del rotor. La luz atraviesa perpendicularmente dicho brazo y llega a un fotodetector. El aumento de adsorbancia debido a la presencia del precipitado se emplea para calcular la concentración del antígeno en estudio.

La adsorbancia puede leerse en equilibrio o en forma cinética. Se prepara una curva estándar que se introduce en un ordenador con el cual se hace la lectura de la concentración.

3.5.1 - INMUNODIFUSION

La finalidad de todas las técnicas de Inmunodifusión es identificar la reacción antígeno-anticuerpo por la reacción de precipitación.

Aunque la formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como el agar, depende de los electrólitos amortiguadores, pH y temperatura, los determinantes más importantes e la reacción son las concentraciones relativas del antígeno y del anticuerpo.

La inmunoprecipitación es el método más directo y simple para la demostración de las reacciones antígeno-anticuerpo en el laboratorio.

La primera observación sobre ls fenómenos de inmunodifusión puede atribuirse a a Petri²³² en 1932 cuando observó las curvas de precipitación que se producian en un cultivo de bacterias productoras de extotoxinas, cuando en el agar de cultivo contenía una antitoxina específica; posteriormente en 1949 Ouchterlony²³³ y Elek, por separado, aplicaron estas observaciones para describir el método de Inmunodifusión Doble en capas de agar sobre laminillas.

Este método hoy todavía en uso, tiene importantes aplicaciones para el análisis e identificación de los sistemas precipitantes antígeno-anticuerpo. Simultaneamente en 1949 Oudin²³³ describió un sistema de difusión aislada del antígeno y del anticuerpo en tubos de ensayo llenos de agar.

En 1957 para mejorar los resultados de los sistemas de análisis por inmunodifusión Feinberg²³² combinó los métodos de Oudin en tubo y de Ouchterlony-Elek, y describió la base de la inmunodifusión radial simple.

En 1963 Tomasi y Zigelbaum modificaron la técnica de Feinberg eliminando la necesidad de esperar al punto final de precipitación para cuantificar las inmunoglobulinas; posteriormente en 1965 Fahey y McKelvey²²⁵ confirmaron la validez de este sistema para el estudio cuantitativo de las inmunoglobulinas.

Ese mismo año, Mancini et al²²⁴ extendieron este sistema de análisis para valorar diversos tipos de antígenos, y con el fin de evitar errores en la medición de los diámetros de los anillos de precipitación, modificaron el sistema de lectura de los discos y esto recibió la denominación de técnica o método de inmunodifusión radial simple de Mancini.

Las reacciones de inmunodifusión tienen su aplicación clínica más importante en la cuantificación de las inmunoglobulinas, del suero o de otros fluidos orgánicos.

Estas reacciones pueden clasificarse en simples o dobles. En la inmunodifusión simple o única el antígeno o el anticuerpo permanece fijo y el otro reactivo se mueve y se acopla con él.

En la inmunodifusión doble, ambos reactivos están libres para moverse el uno hacia el otro y formar los halos de precipitación. En ambas formas el movimiento de uno o de los dos reactivos puede ser lineal o radial.

La técnica de inmunodifusión doble (método de Ouchterlony) está basada en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden a través de un medio semisólido, en este caso el agar y forman complejos inmunitarios estables que pueden ser analizados visualmente.

La prueba se realiza vaciando agar fundido (1-2% en tampón a pH 7,8) sobre placas de Petri y dejando que se endurezca, posteriormente se horadan unos pocillos en el mismo, separados unos milímetros. Las muestras que contienen los antisueros y los antígenos a estudiar se colocan en pocillos opuestos y se dejan que difundan unas hacia otras, en cámara húmeda, durante

18-24 horas. Las líneas de precipitación resultantes son analizadas visualmente, en luz indirecta, con la ayuda de una lupa.

Mediante este método se obtiene información cualitativa sobre el antígeno estudiado, es decir permite por un lado, la identificación de distintos antígenos presentes en la muestra, capaces de reaccionar con el anticuerpo y por otro la comprobación de la existencia o no de determinantes antigenicos compartidos por los antígenos estudiados.

La determinación cuantitativa por la técnica de Ouchterlony se obtiene colocando un pocillo central con el anticuerpo y otros circundándole con distintas diluciones del antígeno en estudio, tras la difusión de ambos se forma una línea de precipitación de un grosor decreciente hasta que desaparece en diluciones 1:32 del antígeno. Al no existir una relación lineal entre el grosor de la línea de precipitación y la concentración del antígeno, solo podemos obtener una información semicuantitativa sobre este último.

Este carácter semicuantitativo del resultado de dicho método, así como su escasa sensibilidad son las que nos ha decantado para nuestro estudio por la técnica de Inmunodifusión Radial Simple o Técnica de Mancini.

3.5.2.1 - INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE (RID)

El método de Inmunodifusión Radial Simple (RID) para uso clínico fue introducido en 1965 por Mancini y col²²⁴ y Fahey y McKelvey²²⁵.

En esta técnica uno de los dos reactantes (generalmente el anticuerpo anti-Ig dirigido a los determinantes Fc o de la cadena H de la inmunoglobulina) es uniformemente distribuido en una capa de agar o agarosa, mientras que el otro reactante (en este caso, la inmunoglobulina a cuantificar) se introduce en concavidades practicadas en el agar. El antígeno difunde de forma radial en la mezcla gel-anticuerpo anti-Ig, formando un anillo visible de precipitado en un punto, que depende de la estequiometría antígeno-anticuerpo.(fig. 15)

A medida que difunde hacia fuera de la concavidad el antígeno, el anillo de precipitación se disuelve en exceso de antígeno y reaparece a una mayor distancia de la concavidad; este incremento en el diámetro del anillo de precipitado continúa con el tiempo, hasta que antígeno y anticuerpo alcanzan el equilibrio.

Existen ciertas relaciones cuantitativas entre el diámetro del anillo y la concentración del antígeno (en este caso, la inmunoglobulina en estudio), tanto para cuando el anillo se está expandiendo como cuando deja de agrandarse. En este último caso la curva que representa el cuadrado del diámetro de los anillos está en función lineal de la concentración de la inmunoglobulina estudiada.

En el primer caso, es decir cuando los diámetros de los anillos continúan creciendo, la representación del logaritmo de la concentración del antígeno esta en función lineal del diámetro del anillo.

La medida de la concentración, cuando los anillos están ya formados, se denomina *Inmunodifusión Radial Limitada*, mientras que la técnica de medida realizada durante la formación de los anillos recibe el nombre de método de Fahey-McKelvey²²⁵ o *Inmunodifusión Radial Cronometrada*. Esta última tiene como ventaja el proporcionar los resultados de forma más rápida (18+/-2 horas) que la técnica del punto final o de Mancini (24-48 horas) pero su precisión o exactitud son bastante menores²³⁴, por lo que para nuestro estudio hemos utilizado la inmunodifusión limitada.

La sensibilidad de las técnicas de Inmunodifusión Radial por el método de Mancini es de 1-3 ug/ml de antígeno, con una desviación estándar por debajo del 2% de la media²²⁴.

A) Técnica

El método que se describe aquí ha sido ideado para difusión limitada.²³⁴

1.- Materiales

- . Placas de Agar WPIC.
- . Pipetas serológicas de flujo rápido (orificio grande) de 10 ml.
- . Frasco de succión con tubo de goma y pipeta Pasteur.
- . Baño de agua a 56°C.
- . Cámara húmeda (dos placas de vidrio encintado, de 30x30 cm) separadas por un marco de Plexiglás de 1,3 cm de espesor.
- . Microscopio de disección con retículo de división de 0.1 mm.
- . Plantilla para formar concavidades. Adherir una hoja de Plexiglás de 0.6 cm. a la tapa de las cajas y con un taladro realizar orificios de 2mm de diámetro.
- . Sacabocados.

2.- Reactivos

-. Buffer de glicina (0.1M, pH 7.(con Merthiolate 1:10.000 como preservador).

-. Agarosa (también se puede usar Special Noble Agar)

-. Sueros:

a) Sueros de referencia.

b) Suero de control interno (de nivel alto y bajo para cada inmunoglobulina).

c) Antisueros:

1-.Anti-IgG (cadena y especifica)

2-.Anti-IgA (cadena a especifica)

3-.Anti-IgM (cadena u especifica)

3.- Preparación de reactivos

a) Buffer de glicina 0.1M, pH 7;0,4M en EDTA

Por cada litro de buffer añadir 7,5 g. de glicina a unos 600 ml de agua destilada; agregar 100 ml de EDTA y 100 ml de Merthiolate 1:10.000. Ajustar el pH a 7.0 +/- 0.05 con NaOH 1N, llevar a un litro y controlar el pH. Como alternativa se puede usar Buffer de fósforos 0.1M. pH 7.0²³⁵.

b) EDTA 0.4M.

Agregar 152 g. de EDTA (ácido etilendinitrilotetraacético), sal tetrasódica y 148,9 g de EDTA, sal disódica dihidratada, a 900 ml. de agua destilada y agitar hasta diluir. Llevar a 1 litro y controlar pH a 7.8.

c) Agarosa al 2%

Colocar agua en un recipiente cuyo fondo se ha cubierto de perlas de vidrio y llevar a ebullición. En un Erlernmeyer de 2 litros, añadir 40 g. de agarosa humedecidos con 300 ml de buffer de glicina frío, y luego agregar los 1.700 ml de buffer calentado. Colocar el matraz en el baño de agua hirviendo y calentar agitando hasta obtener una solución clara. Evitando en todo momento que la solución de agarosa hierva.

Estando aún caliente, verter 12 ml de ésta en tubos de ensayo de 20 ml, dejar enfriar y luego taparlos para evitar su evaporación.

El sistema Agarosa-EDTA se usa principalmente para evitar las propiedades de intercambio catiónico del agar hacia proteínas con migración catódica a pH 7-8.6 y porque evita las alteraciones estructurales de algunas seroproteínas²³⁴.

El uso del Merthiolate 1:10.000 como preservador en lugar de la azida sódica que se empleaba antiguamente, evita la posibilidad de explosión de los compuestos de esta última con sistemas de instalación de cobre o plomo²³⁴.

Otros autores como Margni²³⁶ prefiere utilizar como Buffer el de Veronal Sódico, que habitualmente se utiliza en inmunolectrofóresis y que se prepara disolviendo 11 g de Veronal sódico en 900 ml de agua destilada, añadiendo luego HCl N hasta pH 8.4 (aproximadamente 16 ml) completando con agua destilada hasta un litro.

4.- Preparación de las placas de Inmunodifusión

Para la preparación de las placas se deben utilizar lotes de antisueros generalmente estandarizados por la O.M.S. o por laboratorios comerciales, en este último caso debe usarse todos los antisueros procedentes del mismo suministrador comercial para evitar las variaciones interlaboratorios; pero en ambos casos los lotes deben ser lo suficientemente grandes para evitar la determinación repetida de la dilución conveniente. Los pasos a seguir son:

10.- Rotular tres placas de Agar, indicando las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20.

2Q.- Pipetear 2ml, 1ml y 0.5ml respectivamente, de antisuero en tubos rotulados, 1:5, 1:10 y 1:20 y colocarlos en baño de agua a 56Q C.

3Q.- Disolver 35 a 40 g de agarosa al 2% en baño maría hirviendo y transferirla al baño de agua a 56Q C. Cuando la solución de agarosa se enfria, 56-60Q C, introducir parte de ésta en una pipeta serológica de 10 ml de boca ancha; repetir 2 o 3 veces para calentar la pipeta y luego pipetear 8ml, 9ml y 9,5ml de agarosa, respectivamente en los tubos rotulados 1:5, 1:10 y 1:20. Mezclar bien los contenidos mientras los tubos permanecen en el baño de agua a 56Q C.

4Q.- Transferir el contenido de cada tubo a las placas de agar correspondientes formando en ellas una capa de agarosa de unos 2mm de espesor, quitando las burbujas de aire que se puedan formar con un alambre caliente y dejandolas enfriar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

5Q.- Utilizando la plantilla de Plexiglás y el sacabocados practicar las concavidades en las placas.

6Q.- Eliminar los tapones de agarosa de las concavidades mediante succión con la pipeta Pasteur.

Las placas así preparadas pueden conservarse a 4°C durante 2 semanas o más, si se las envuelve en Sarán para evitar la evaporación.

5.- Obtención de las Curvas Estándar de Referencia

Generalmente se utilizan sueros de referencia igualmente estandarizados por la OMS, así tenemos por ejemplo la *Preparación de Referencia de la OMS para IgA, IgG e IgM*, cada ampolla de esta preparación es una mezcla liofilizada que contiene 100 unidades internacionales (arbitarias) equivalentes a 80.4 ug de IgG, 12.4 ug de IgA y 8.47 ug de IgM. Los pasos a seguir son:

1º.- Diluir el suero de referencia en solución salina 1:50 para IgG, 1:10 para IgA y 1:2 para IgM.

2º.- El suero diluido como se ha indicado (100%) y las posteriores diluciones al 75, 50, 25 y 12,5% de dicho suero estándar, se utilizan para llenar las concavidades realizadas en las placas de agar así mismo, en dos de esas concavidades introducir un volumen constante de estándar interno alto y otro estándar bajo, diluidos como se indicó en el paso 1º.

3Q.- Incubar las placas en cámara húmeda a 37°C durante 20-24 horas (24-48 horas para la IgM).

4Q.- Después de este tiempo medir, los diámetros de los halos de precipitación invirtiendo la placa sobre un soporte de luz que permita el paso de la misma en forma oblicua de una lámpara de alta potencia colocada debajo. Medir los diámetros con un sistema de precisión. Si los anillos son ovalados en vez de redondos, tomar el promedio de dos medidas efectuadas formando ángulo recto entre sí; si los anillos son demasiado grandes o de bordes desdibujado es que el antisuero estaba muy diluido y viceversa si son muy pequeños es que estaba muy concentrado. Calcular el promedio de las determinaciones efectuadas por duplicado, y el cuadrado de los diámetros (D^2 en milímetros cuadrados) y registrar los datos. (Gráfico 1)

5Q Con una regla trazar la mejor recta posible; se puede utilizar la porción de curva que es lineal o casi lineal. No se debe extender por encima o debajo de la porción lineal. Si la línea abarca la escala de concentraciones de interés, puede usarse. Sino, habrá que variar el tiempo, la temperatura y/o la concentración de los reactantes.

6Q.- Determinar la mayor dilución que produce anillos de unos 7 mm de diámetro con los estándares altos. Se deben obtener anillos de unos 4 mm de diámetro con el estándar de trabajo diluido a 12,5%, los diámetros menores de 3,5 mm habitualmente no se pueden medir con exactitud.

7Q.- Para las placas de niveles bajos elegir una dilución de antisuero de forma que produzca un anillo de unos 7 mm de diámetro para el estándar de trabajo al 25% y diluir en forma apropiada.

8Q.- Repetir los pasos del 3 al 7 con diluciones intermedias de antisueños para lograr resultados óptimos.

Las principales fuentes de error en la técnica de Inmunodifusión Radial son²³²:

-.Derramamiento del antígeno o de las soluciones estándar fuera de las concavidades.

-.Anillos demasiado grandes o pequeños, debido a exceso de antígeno o de anticuerpo.

-.Cavidades incompletamente llenadas, lo cual suele ocurrir cuando se utilizan capilares para la distribución, o que contengan las cavidades burbujas de aire.

-.Concavidades de bordes irregulares que distorsionan los anillos.

-.Placas conservadas demasiado tiempo, con la consiguiente evaporación o distorsión del gel de agarosa.

-.Gel de agarosa de espesor disparejo,

-.Levantamiento de la agarosa al quitar los tapones con la pipeta Pasteur, lo cual permite que la muestra se filtre a través del fondo de la concavidad.

FIGURA 15.- Placa de Inmunodifusión Radial,
mostrando los anillos de reacción IgA-antisuero.

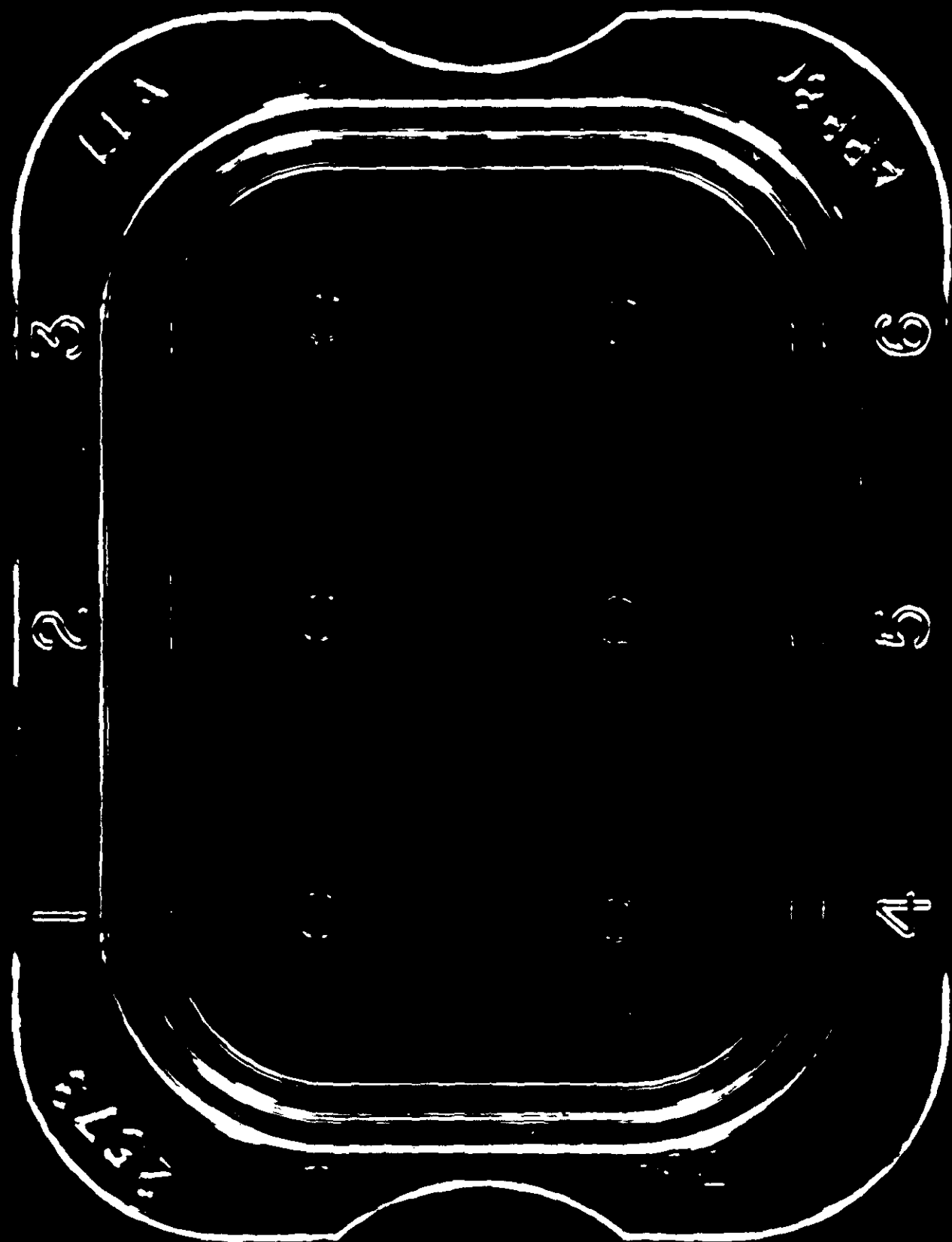
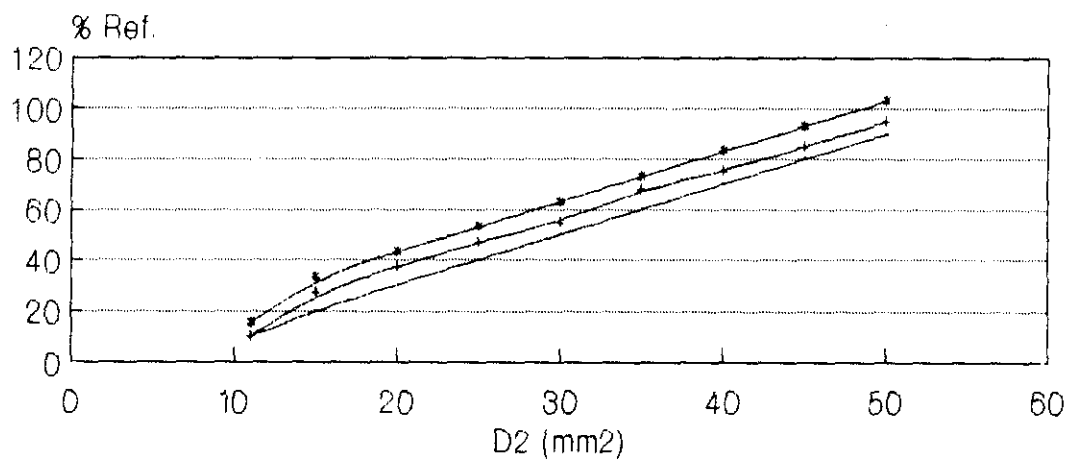


GRAFICO 1

CURVA PATRON



INMUNOGLOBULINAS

— IgA + IgG + IgM

Grafico 1: Modelo de Curva Patron
utilizada en Inmunodifusion Radial
(C.A.P. 1982)

4. - MATERIAL Y METODOS

4.- MATERIAL Y MEDOTOS

4.1.- SUJETOS ESTUDIADOS

Para la realización de este trabajo se seleccionaron, 125 sujetos ingresados los Servicios de Neumología y Medicina Interna del Instituto Médico Municipal Fabiola de Mora y Aragón perteneciente al Excelentísimo Ayuntamiento de Madrid.

De los 125 pacientes estudiados, durante un periodo de cuatro años (1987-1991), trece fueron excluidos por una o varias de las siguientes razones: -. no haber alcanzado un diagnostico definitivo (6 casos); -. escasa viabilidad de la muestra obtenida (5 casos); -. deterioro de la muestra durante su procesado (2 casos)

Los 112 casos analizados en este estudio correspondieron a sujetos adultos: 97 varones (86,6%) y 15 mujeres (13,39%) de edades comprendidas entre los 40-90 años con una media de (67,51+/-8,73), 62 fumadores (55,35%) y 50 no fumadores (44,64%). (Gráfico 2)

A todos los sujetos se les practicaron los estudios clínicos, radiológicos, analíticos y anatomopatológicos necesarios para llegar a un diagnóstico.

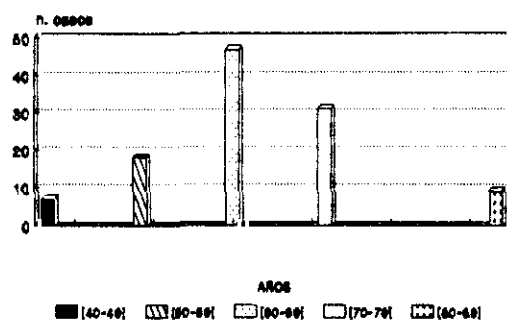
En todos los casos este diagnóstico se estimó de certeza, excepto en uno que fue de sospecha y posteriormente se confirmó en la autopsia. Como resultado de este estudio previo se dividió a los 112 sujetos en dos grupos: Grupo Control Normal y el Grupo Patológico.

El Grupo Control Normal lo forman 12 personas (10,71%), 6 varones (50%) y 6 mujeres (50%), de edad comprendida entre 40 y 89 años con una media (52,15+/-8,7) años. De los cuales 6 (50%) eran fumadores y 6 (50%) eran no fumadores.

En este grupo hemos incluido sujetos en los cuales no se objetivó patología neumológica alguna tras haber completado todo el estudio médico, ni refieren antecedentes de enfermedad pulmonar crónica ni aguda en los últimos seis meses.

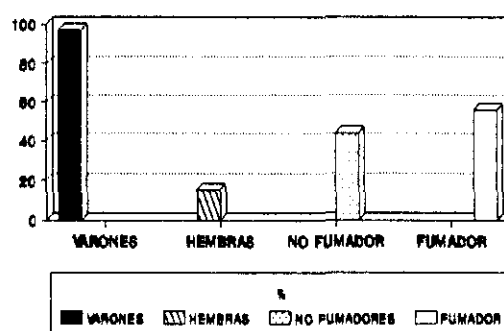
A estos sujetos se les practicó una broncoscopia por las razones siguientes: disfonía (5 casos), sospecha de aspiración de cuerpo extraño (4 casos), posibles hemoptisis (3 casos).

GRAFICO 2
EDAD



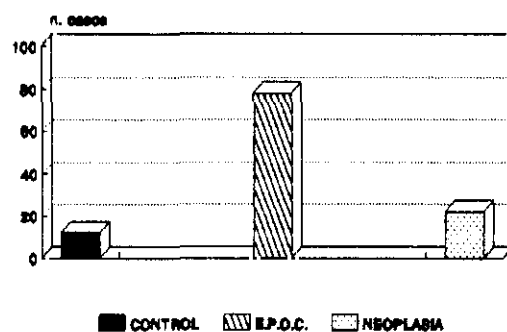
Distribucion de edades dentro de la muestra

GRAFICO 2
SEXO



Distribucion por sexos del conjunto de la muestra estudiada

GRAFICO 2
MUESTRA ESTUDIADA



Distribucion de la muestra estudiada segun el tipo de patologia

GRAFICO 2
DATOS SIGNIFICATIVOS

PACIENTES CON E.P.O.C.:

	SI	NO
FUMADORES	40(51.29%)	38(48.71%)
COR PULMONALE	33(42.31%)	45(57.69%)

PACIENTES CON NEOPLASIA:

	SI	NO
FUMADORES	16(76.19%)	6(23.81%)
COR PULMONALE	2(9.52%)	20(90.48%)

El Grupo Patológico lo integran 100 personas (89,28), 91 hombres (91%) y 9 mujeres (9%) de edad media (67,51+/-8,73), (40-90 años), con un amplio espectro de procesos morbosos de los que caben destacar los cuadros de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (E.P.O.C.) y las Neoplasias primarias o secundarias del aparato respiratorio.

Con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, (E.P.O.C.- Bronquitis Crónica) se estudiaron 78 personas (78%), de edades comprendidas entre (40-89 años) con una media de (66,45+/-9,72) de ellas 9 mujeres (11,5%) y 69 varones (88,46%); 40 fumadores (51,2 %) y 38 no fumadores (48,7%). De estos enfermos con E.P.O.C., 33 de ellos (42,3%) presentaban sobreañadido un cuadro de Cor Pulmonale Crónico y no lo presentaban 45 (57,6%). De los pacientes estudiados 12 (15,3%) presentaban además del cuadro de las E.P.O.C. algún tipo de Neoplasia Pulmonar.

Con Neoplasia primaria del aparato respiratorio se estudiaron 21 enfermos (21%), todos ellos varones de edades comprendidas entre (40-89 años), con una media de (64,22+/-8,63), 16 fumadores (76,1%) y 5 no fumadores (23,8%). Dentro de estas Neoplasias pulmonares primarias se identificaron 9 Carcinomas Epidermoides (42,85%), 10 Carcinomas Broncogénicos tipo "Oat cell" (47,6%), 2 Adenocarcinomas (9,52%).

Por lo que respecta al Estadio de estas neoplasias, 9 (42,85%) se encontraban en Estadio I, y 12 (57,15%) en Estadio III, y 0 (0%) en Estadio II.

En cuanto a la clasificación T.N.M. se encontraron 3 (14,28%) en Estadio T1, 7 (33,30%) en Estadio T2, 11 (52,3%) en Estadio T3; 14 (66,6%) en Estadio N0, 6 (28,5%) en Estadio N1, 1 (4,76%) en Estadio N2; 19 (90,4%) en Estadio M0 y 2 (9,53%) en Estadio M1.

Con Neoplasias secundarias o metastásicas del pulmón se estudió 1 caso (1%) correspondiente a un varón de 61 años, fumador, con metástasis pulmonar de un carcinoma primitivo de aparato digestivo de células en anillo de sello.

De los sujetos con Neoplasia Pulmonar, primaria o secundaria 2 (9.09%) presentaban sobre añadido un cuadro de Cor Pulmonale Crónico y los otros 20 (90.9) no lo presentaban.

Los sujetos estudiados del Grupo Patológico presentaban sobreañadidos otros procesos morbosos, tales como Diabetes Mellitus, Silicosis, Infecciones Urinarias, a los que no vamos a prestar especial interés ya que no están directamente implicados en el estudio que nos ocupa.

4.2. - MATERIAL FISICO

Para la obtención de muestras en ambos grupos de estudio, Grupo Control y Grupo patológico, el material físico empleado varió sensiblemente; así tenemos que en el Grupo control las muestras se obtuvieron mediante Lavado Broncoalveolar realizado en el curso de las broncofibroscopias que, como anteriormente se indicó se realizaron a los sujetos control, el material para el Lavado Broncoalveolar se limita a: 1) Broncofibroscopio de adultos "Olimpus BF-B10", con una fuente de luz fría; 2) jeringas de plástico de 50 ml; 3) frascos de plástico o vidrio siliconado; 4) nevera de plástico con hielo.

En estos mismos sujetos y para estudiar posibles variaciones en la tasa de IgA según el método de obtención de las muestras, también se realizó la determinación en esputo, siguiendo la técnica descrita más adelante, utilizada para los sujetos del grupo patológico.

En los sujetos del grupo patológico las muestras de estudio se obtuvieron mediante recogida de esputo, el material físico necesario para esto se limitó a: 1) Nebulizadores; 2) suero fisiológico iso e hipertónico; 3) frascos de plástico o vidrio siliconado estériles de cierre hermético..

4.3. - METODOS EMPLEADOS

4.3.1. - LAVADO BRONCOALVEOLAR

El Lavado Broncoalveolar en los sujetos control se realizó en quirófano, contando en todo momento con equipo material y humano para reanimación cardiopulmonar, por si ello fuera necesario. Los lavados se efectuaron con los pacientes en decúbito supino con un fibrobroncoscopio (FBC) Olympus BF-B10, con una fuente de luz fría.

Se procuró que los pacientes no fumaran en las 48 horas previas para evitar la irritabilidad tusígena. De igual forma se mantuvo a los sujetos en ayunas desde seis horas antes de la exploración. En todas las ocasiones se interrogó a los sujetos sobre posibles alergias medicamentosas al anéstesico local.

Se controlaron los tiempos de coagulación, sangría y protrombina y el recuento de plaquetas. Se determinó previamente los gases en sangre arterial.

En todos los casos se hizo un electrocardiograma (ECG), radiografías de tórax y espirometría, antes de la exploración.

Premedicación: 30 minutos antes de la endoscopia se les infectó de 0,5-1 mg de atropina por vía intramuscular, con el fin de disminuir las secreciones orofaríngeas y los reflejos vagales.

Con los sujetos en decúbito supino, se les efectuó anestesia tópica por nebulización con tetracaína en vías aéreas superiores e instilación intratraqueal de 2-4 ml de lidocaína al 2% por punción intracricotiroidea. Posteriormente se introdujo el FBC por vía nasal. Una vez explorados ambos árboles bronquiales y aspiradas las secreciones, se enclavó la punta del FBC en un bronquio segmentario o subsegmentario del lóbulo medio o de la lingula preferentemente.

A continuación se procedió a instilar a través del canal de aspiración del FBC, una solución estéril de cloruro sódico al 0,9% y a temperatura ambiente en tres bolos sucesivos de 50ml, con una jeringa de plástico, hasta instilar un total de 150 ml; unos treinta segundos después de cada instilación el liquido fue aspirado con la misma jeringa evitando el colapso bronquial.

El liquido obtenido se recogió en tubos de plástico siliconado numerados del 1 al 3, según el orden de recogida, que se dispusieron inmediatamente en hielo (4°C) para su

traslado, lo más rápidamente posible al Laboratorio para su procesamiento.

4.3.2.- OBTENCION DE ESPUTO

En el grupo patológico ante el elevado número de pacientes en los que existía alguna de las contraindicaciones para realizar el Lavado Broncoalveolar, tales como: 1.- falta de colaboración del sujeto; 2.- angor inestable o infarto de miocardio en los últimos seis meses,; 3.- insuficiencia cardiaca; 4.- presencia de un cuadro de infección bronquial aguda; 5.- presión arterial de anhídrido carbónico (PCO_2) superior a 50mmHg y/o presión arterial de oxígeno (PO_2) inferior a 65 mmHg, a pesar del tratamiento con oxígeno.

Esta última que para algunos autores²³⁷ es una contraindicación relativa, nosotros la consideramos como una contraindicación absoluta en este estudio ya que, algunos de nuestros pacientes estudiados presentaban un importante grado de hipoxemia que podría incluso haberse agravado más al realizar el Lavado Broncoalveolar, por la ocupación de líquido en el alveólo que se produce durante este tipo de maniobra exploratoria.

Por todo ello en el Grupo Patológico las muestras para estudio se obtuvieron de esputo procedente de una expectoración profunda, previa limpieza de la cavidad oral con suero fisiológico; en aquellos casos en los que existían dificultades para la obtención espontánea del esputo éste se indujo mediante la aplicación de nebulizadores de glicol-propileno al 15% y cloruro sódico al 10%.

En los casos en los que se estimuló la producción del esputo la técnica fue la siguiente: la solución se precalentó a 25°C., para obtener una niebla espesa se usó una presión de 5-10 ml de agua. El sujeto se sienta en una silla y se coloca en nebulizador en su mesa a nivel de la cara, dicha nebulización se respiraba por lo menos durante 30 minutos. En nuestro trabajo no se observaron con esta técnica efectos adversos.

La recogida del esputo se practicó por la mañana entre las 8 y las 10 horas, manteniendo a los pacientes en ayunas desde seis horas antes de la recogida. Por término medio se recogieron muestras con un volumen de esputo comprendido entre 5-10 ml.

Las muestras se recogieron en recipientes estériles de cierre hermético que se introducían para su conservación en

hielo (4°C) y se trasladaron al Laboratorio para su procesamiento.

4.3.3. - PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras obtenidas del grupo control y del grupo patológico se realizaba inmediatamente a su llegada al Laboratorio. En Las muestras del primer grupo (grupo control) se desechaba el frasco "nº1" ó lavado bronquial. A continuación el contenido del frasco "nº2" y "nº3" se centrifugó a 200 g. separandose en dos fracciones, el sedimento celular y el sobrenadante. Para la realización de este trabajo se procedió a separar ambas fracciones para utilizar el sobrenadante.

Una vez aislado el sobrenadante, se congeló a -25°C, para su conservación hasta la posterior determinación inmunoquímica.

Las muestras de esputo obtenidas del grupo de sujetos patológicos, se procesaron tomando 3 ml de la muestra y 3 ml de suero fisiológico isotónico para su homogeneización en el mortero de Potter. El material homogeneizado se centrifugó a 200 g., durante 10 minutos, quedando la muestra fraccionada en tres fases. Con una pipeta Pasteur se recogió el sobrenadante,

de la fase acuosa fue congelado a -25°C hasta su remisión al Laboratorio de inmunoquímica para la cuantificación de la IgA y de la concentración de proteínas totales (Pt).

4.3.4. - INMUNODIFUSION RADIAL (RID)

La cuantificación de la concentración de IgA se realizó en el Laboratorio de Inmunología mediante la técnica de Inmunodifusión radial (RID) simple por el método de Mancini²²⁴.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente en el momento de su utilización. Durante el tiempo empleado para su procesamiento se mantuvieron a una temperatura de 2 a 4 $^{\circ}\text{C}$. Todo ello para evitar roturas moleculares de los distintos componentes bioquímicos.

La cuantificación de la Inmunoglobulina IgA se realizó mediante RID limitada, para ello el primer paso fue la fabricación de las placas de difusión:

A) Materiales

- Placas de agar WPIC.
- Pipetas serológicas de flujo rápido de 10 ml.

- .Frasco de succión con tubo de goma y pipeta Pasteur.
- .Baño de agua a 56°C.
- .Cámara húmeda.
- .Microscopio de disección con retículo de división de 0,1 mm.
- .Plantilla para formar concavidades (hoja de Plexiglas)
- .Sacabocados de 2mm de diámetro.

B) Reactivos

- .Buffer de glicina (0,1M, pH: 7,0 con Merthiolate 1:10.000 como preservador)
- .Agarosa.
- .Estándar de la Inmunoglobulina específica.
- .Antisero Anti-IgA (cadena alfa específica).
- .Sobrenadante de las muestras en estudio.

C) Preparación de los reactivos

a) Buffer de glicina, 0,1M, pH: 7,0; 0.4M en EDTA.

Por cada litro de Buffer añadir 7,5 gramos de glicina a 600 ml de agua destilada, agregar 100 ml de EDTA 0,4 y 100 ml de Merthiolate 1:10.000. Ajustar a pH: 7,0 +/- 0,05 con NaOH, llevar a un litro y controlar el pH.

b) EDTA 0,4 M

Agregar 152 g. de EDTA (sal tetrasódica) y 148,9 g. de EDTA sal disódica dihidratada, a 900 ml de agua destilada, agitar y llevar hasta un litro (pH:7,8).

c) Agarosa al 2%

Colocar agua en un recipiente y cubrir el fondo con bolas de vidrio, llevar a ebullición. En un Erlenmeyer de 2 litros, añadir 40 g. de agarosa humedecidos en 300 ml de buffer de glicina frío, y luego agregar los 1700 ml del buffer calentado.

Colocar el matraz en el baño de agua hirviendo, hasta obtener una solución clara evitando en todo momento que la agarosa hierva.

D) Preparación de las placas de Inmunodifusión

Una vez preparada la solución de agarosa-EDTA, se deja enfriar cuanto esté a una temperatura de aproximadamente 56°C. se mezcla con el antisuero específico Anti-IgA, obtenido comercialmente; suministrado por (Meloy Laboratories, Springfield, Virginia; Hyland Division Travenol Laboratories,

Los Angeles, California), específica para la fracción 11S de la IgA previamente calentado a 56°C.

Posteriormente se debe verter la mezcla en las placas de vidrio, dada la mala adherencia de los geles de agarosa al vidrio es conveniente precubrirlos para poder ser usados.

Para ello se limpian las placas con detergente neutro de modo que su superficie sea uniformemente humedecible. Luego se las sumerge en una solución caliente de agarosa al 0,2% en agua destilada. Las placas ya precubiertas se dejan secar a temperatura ambiente.

Una vez preparadas las placas se deben cubrir con la mezcla del agar y del antisuero, se utilizó la preparación comercial, antes mencionada, para ello con una pipeta serológica de 10 ml de boca ancha se recubren las placas pretratadas con una capa de mezcla de unos 2 mm de espesor.

A continuación se dejan enfriar las placas a temperatura a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos.

Utilizando la plantilla de Plexiglás se realizan con el sacabocados seis pocillos de unos 2 mm de diámetro en el agar, los pocillos deben estar situados a una distancia conveniente

para evitar interferencias, los tapones de agarosa de los pocillos se eliminan con la pipeta de succión de Pasteur.

E) Cuantificación de la Inmonoglobulina IgA

Una vez preparadas las placas de Inmunodifusión se procede a la cuantificación de la inmunoglobulina estudiada, para ello se utiliza el estándar de inmunoglobulina específica.

Para este estudio se utilizó Innomuglobulina IgA estándar obtenida comercialmente de la Preparación de Referencia de la O.M.S. para la IgA Humana, cada ampolla de esta preparación contiene 100 unidades internacionales (arbitrarias), realizadas las correlaciones pertinentes Rowe y col²³⁸, demostraron que 1,00 unidad internacional equivale a 14,2 microgramos de IgA.

La IgA estándar se somete a dilución con solución salina 1:10, es decir al 100%, y posteriormente se vuelve a diluir al 75%, al 50%, al 25% y al 12,5%.

Una vez preparadas las muestras a estudiar y la IgA estándar se procede a rellenar los pocillos de las placas; en cada placa se cubren 5 pocillos con 2 ul de cada una de las diluciones de a IgA estándar y el sexto pocillo se rellena con 2 ul del sobrenadante obtenido de las muestras a estudiar.

Una vez rellenas las placas se dejan incubar en cámara húmeda a 37°C. durante 20-24 horas.

La evaluación de los resultados se hizo mediante la determinación del diámetro del halo de precipitación, en campo oscuro mediante el microscopio de disección. Para ello se trazó una gráfica en la que se representó en el eje X el cuadrado de los diámetros de los halos de precipitación de las diluciones de IgA estándar, y en el eje Y se reflejaron las concentraciones conocidas, de las soluciones estándar. Con ambos valores se trazó una curva patrón sobre la cual se fueron determinando las concentraciones de las muestras estudiadas, expresada en microgramos por ml ($\mu\text{g/ml}$).

4.3.5. - METODO DE LOWRY

De las distintas técnicas utilizadas para la determinación de las proteínas totales, tales como el procedimiento de Kleldahl, el método de Biuret, uno de los más ampliamente utilizados es el método de Lowry²³⁹.

En esta técnica a las proteínas, pretratadas con solución alcalina de cobre, se añade el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteau. Los residuos de tirosina y triptófano de la

proteína, así como los complejos cobre-enlace peptídico reducen los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico a azul de tungsteno y molibdeno respectivamente.

A) Reactivos

-.Reactivo A: Na_2CO_3 (peso:volumen) en NaOH 0.1 mol/l.

-.Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% (peso:volumen) y tartrato sódico potásico al 1% (peso:volumen) en agua destilada. Conservar al abrigo de la luz.

-.Reactivo de Folin-Ciocalteu 2 equ/l. En el momento de su uso diluir 1:1 con agua destilada.

-.Solución estándar de albúmina de suero bovino 0.1 g/l. Conservar alicuotado y congelado a -20°C .

-.Cloruro sódico 0.15 mol/l.

B) Procedimiento

El ensayo se realizó por duplicado (dos tubos por cada estándar, control o muestra).

10-. A partir de una alicuota de albúmina bovina 0.1 g/l diluir convenientemente para obtener concentraciones de 0, 20, 40, 80 ,y 100 ug/ml. Estas diluciones se utilizaran para el trazado de la curva de calibración.

20-. Preparar diluciones 1/10, 1/20, 1/30, y 1/40 de cada muestra con NaCl 0.15 mol/l. Seguidamente diluir todas ellas 1/5 con agua destilada.

30-. Colocar 500 ul de cada estándar y de cada dilución de las muestras en tubos de ensayo (por duplicado). Mezclar 50 volúmenes de reactivo A con 1 volumen de reactivo B. Añadir 1.25 ml de esta mezcla a cada tubo. Incubar diez minutos a temperatura ambiente.

40-. Añadir 250 ul de reactivo de Folin Ciocalteau (diluido 1:1) a cada tubo. Agitar enérgicamente e incubar treinta minutos a temperatura ambiente.

50-. Medir la absorbancia de cada tubo a 650 nm.

60-. A partir de una curva de calibración, trazada utilizando las densidades ópticas de los estándares, deducir la concentración proteínica de cada muestra. Considerar para cada muestra aquella dilución que haya producido una densidad óptica que entre dentro del rango de los estándares empleados.

4.4. - PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS

En todos y cada unos de los sujetos controles y pacientes, se estudiaron los siguientes parámetros: edad, sexo y el carácter de fumador o no. Se definió como "fumador" aquél que fumaba en la época de realizar en estudio (la mayoría un promedio de 20 cigarrillos/día), el carácter de "no fumador" se aplicó a aquellos que no habían fumado en toda su vida.

En el grupo patológico se analizaron las siguientes situaciones:

- . Presencia de E.P.O.C.;
- . Presencia de Cor Pulmonale crónico;
- . Presencia de neoplasias pulmonares:
Primarias y/o Metastásicas.

4.1. - PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Para alcanzar los objetivos fijados en este estudio, el total de sujetos estudiados se dividió de las siguientes maneras:

12.- Por un lado se subdividió en dos grupos según la ausencia o presencia de enfermedad broncopulmonar:

- GRUPO CONTROL: (ausencia de enfermedad broncopulmonar), formado por 12 sujetos adultos sin evidencia de enfermedad broncopulmonar.

En este grupo se estudió la influencia que sobre la concentración de IgA pudiera tener el hábito de fumar. Así como las modificaciones que sobre los niveles de IgA, se pudieran producir según la muestra se obtuviese por Lavado Broncoalveolar o por técnicas de expectoración.

- GRUPO PATOLOGICO: (presencia de enfermedad broncopulmonar), formado por 100 pacientes adultos con un espectro de enfermedades broncopulmonares, integrado esencialmente por cuadros de E.P.O.C. 78 de ellos y cuadros de neoplasias pulmonares primarias ó secundarias 22 de ellos; ambos subgrupos presentaban diversos diagnósticos asociados.

20.- Por otro lado el grupo patológico se subdividió a su vez en los siguientes subgrupos:

A) Pacientes con E.P.O.C*.(como entidad principal)

B) Pacientes con Neoplasia Pulmonar* (como entidad principal)

* [con otros diagnósticos asociados]

Dentro de ambos subgrupos A y B se estudió la influencia que sobre la concentración de IgA pudiera tener el tabaquismo, la presencia de Cor Pulmonale Crónico, el tipo histológico de Neoplasia y la asociación al unísono de ambos cuadros patológicos.

La influencia de la edad el sexo se estudió en el conjunto de la muestra tanto normal como patológica.

4.2. - METODO ESTADISTICO

El análisis estadístico de los datos se ha realizado mediante el programa "Aplication Sistem" de IBM en el campo de "informáticos" estadísticos "ABSTAT", para proporcionar:

1) Estadística descriptiva: media, desviación estándar, valores máximos y mínimos y distribución de frecuencias.

2) Comparación de medias entre los grupos formados, para evaluar posibles diferencias significativas.

3) Coeficientes de correlación entre cada uno de los parámetros estudiados para valorar la posible presencia de una correlación lineal entre ellos.

4) Utilización del coeficiente de Durbin-Watner, para conocer perturbaciones aleatorias en la matriz de regresión.

Se consideró significación estadística una ($p < 0,05$). Los resultados expresados a lo largo del trabajo vienen dados como media +/- DE.

La concentración de IgA se estandarizó respecto a la de proteínas totales encontradas en las muestras para evitar el efecto dilucional (vease más adelante).

La transformación logarítmica neperiana de los resultados [L-IgA/Pt] se utilizó, para evitar la dispersión de los valores obtenidos. El texto ha sido procesado en un PC PHILIPS PCD304/16 386.

5. - RESULTADOS

5. - RESULTADOS

Los datos de cada [IgA/Pt] de todos los sujetos estudiados en nuestro trabajo se detallan en la tabla XII.

5.1. - Resultados de la determinación cuantitativa de la [IgA/Pt] en los dos grupos seleccionados (Grupo Control y Grupo Patológico).

A1) Grupo Control [Muestra: Lavado Broncoalveolar]

En el Grupo Control formado por 12 sujetos adultos (10.71%) sin patología broncopulmonar previa se obtuvo, en las muestras obtenidas mediante Lavado broncoalveolar, un valor medio de [IgA/Pt], ($X=3.93\pm 2.02$ ug/ml) cuya transformada logaritmica [L-IgA/Pt] da un valor de ($X^*=1.19\pm 0.62$ ug/ml).[Tabla XIII]

A2) Grupo control [Muestra: esputo]

El valor medio de [IgA/Pt] de las muestras obtenidas por expectoración en el grupo control es de ($X=3.98\pm 2.07$ ug/ml) con una [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.20\pm 0.63$ ug/ml); valor ligeramente aumentado respecto a las muestras obtenidas por LBA, pero dicho aumento no es estadísticamente significativo ($p < 0.25$).[Tabla XIII]

B) Grupo Patológico

En el Grupo Patológico formado por 100 pacientes (89.28%), en los cuales las enfermedades broncopulmonares de base eran del grupo de las Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas (E.P.O.C.) o del grupo de las Neoplasias Pulmonares, primarias o metastásicas, se obtuvo un valor medio de concentración de Inmunoglobulina A/Pt ($X=20.24\pm 18.80$ ug/ml) con una transformada logarítmica [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.65\pm 0.87$ ug/ml).

Dicha diferencia de valores medios en la concentración de Inmunoglobulina A/Pt, en ambos grupos Control y Patológico resultó estadísticamente significativa obteniendo una ($p < 0.005$). [Gráfico 3]

5.2. - Resultados de la determinación de la [IgA/Pt] en el Grupo Control de sujetos según tuvieran o no el hábito de fumar.

El grupo control estaba formado por 6 sujetos fumadores (50%) y 6 no fumadores (50%). El valor medio de concentración de [IgA/Pt] en el grupo de fumadores ($X=3.58\pm 2.09$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.09\pm 0.62$ ug/ml) resultó disminuido respecto del grupo control no fumador ($X=4.28\pm 1.8$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.29\pm 0.63$); pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P < 0.25$).

5.3. - Resultados de la determinación de la [IgA/Pt] en el Subgrupo Patológico cuya Enfermedad Broncopulmonar de base resultó ser la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (E.P.O.C.).

En el grupo total de pacientes estudiados en los que su enfermedad broncopulmonar de base era una E.P.O.C.(78%), se obtuvo un valor medio de [IgA/Pt] ($X=20.30\pm 19.45$ ug/ml), con una [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.61\pm 0.87$ ug/ml); aumentado respecto al Grupo Control (10.7%), cuyo valor medio de [IgA/Pt] era ($X=3.93\pm 2.02$ ug/ml); con una [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.19\pm 0.62$ ug/ml).[Tabla XIV]

Dicho aumento resultó con marcada significación estadística ($p < 0.005$).[Gráfico 3]

5.3.1. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con E.P.O.C. según presentasen o no Cor Pulmonale Crónico como diagnostico asociado.

En el Subgrupo de pacientes con E.P.O.C. que además, presentaban como diagnostico asociado un cuadro de Cor Pulmonale Crónico (42.3%), el valor medio de [IgA/Pt] obtenido ($X=23.10\pm 20.46$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.77\pm 0.85$ ug/ml) estaba aumentado con respecto al subgrupo de pacientes con E.P.O.C. sin Cor Pulmonale Crónico, (57.6%) ($X=18.21\pm 18.36$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.45\pm 0.87$ ug/ml).[Tablas XVI y

Tabla XVII]. Pero dicho aumento no fué estadísticamente significativo ($p < 0.20$).[Gráfico 4]

5.3.2. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con E.P.O.C. según tuviesen o no el habito de fumar.

En el conjunto de pacientes con E.P.O.C. que además presentaba el habito de fumar (51,2%), se obtuvo un valor medio de [IgA/Pt] ($X=17.55 \pm 18.74$ ug/ml), con una [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.50 \pm 0.89$ ug/ml), disminuido respecto a los no fumadores ($X=23.01 \pm 19.72$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.72 \pm 0.86$ ug/ml).[Tablas XVIII y XIX] Pero dicha disminución no fue estadísticamente significativa ($p < 0.25$). [Gráfico 5]

5.4. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes cuya Enfermedad Broncopulmonar de base resultó ser una Neoplasia Pulmonar Primaria o Metastásica.

En el grupo de pacientes estudiados cuya enfermedad broncopulmonar de base era una Neoplasia Pulmonar, primaria o metastásica (22%) se obtuvo un valor medio de [IgA/Pt] ($X=20.74 \pm 16.31$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.77 \pm 0.83$ ug/ml), aumentado respecto al grupo de sujetos control ($X=3.93 \pm 2.02$). y ($X^*=1.19 \pm 0.63$ ug/ml).[Tabla XV] Dicho aumento resultó estadísticamente significativo ($p < 0.005$). [Gráfico 3]

TABLA XII

Valores de [IgA/Pt] obtenidos en total de los casos

VARIABLE: [IgA/Pt]

VALUE	FREQ	CUM FREQ	%	CUM %	% SCORE	[L-IgA] VALUE
1.00000	1	1	1.0	1.0	-0.954560	0.00000
1.10000	1	2	1.0	2.0	-0.943546	0.09533
2.00000	1	3	1.0	3.0	-0.934452	0.69314
2.40000	1	4	1.0	4.0	-0.914256	0.87546
3.00000	2	6	2.0	6.0	-0.921205	1.09861
3.10000	2	8	2.0	8.0	-0.915909	1.13140
3.60000	1	9	1.0	9.0	-0.889427	1.28093
3.70000	2	12	2.0	12.0	-0.884130	1.30833
3.80000	2	14	2.0	14.0	-0.878834	1.33500
3.90000	1	15	1.0	15.0	-0.873537	1.36098
4.00000	1	16	1.0	16.0	-0.863452	1.38629
4.20000	2	18	2.0	18.0	-0.857649	1.43508
4.50000	1	19	1.0	19.0	-0.847634	1.50408
4.60000	1	20	1.0	20.0	-0.836463	1.52606
4.80000	1	21	1.0	21.0	-0.825870	1.56862
4.90000	1	22	1.0	22.0	-0.820573	1.58924
5.20000	2	24	2.0	24.0	-0.904684	1.64866
5.50000	1	25	1.0	25.0	-0.900468	1.70475
5.70000	1	26	1.0	26.0	-0.778282	1.74047
5.80000	2	28	2.0	28.0	-0.772906	1.75786
6.00000	2	30	2.0	30.0	-0.762313	1.79176
6.30000	2	32	2.0	32.0	-0.746423	1.84055
6.50000	1	33	1.0	33.0	-0.735421	1.87180
6.80000	1	34	1.0	34.0	-0.719941	1.91692
7.00000	5	39	5.0	39.0	-0.709349	1.94591
7.40000	2	41	2.0	41.0	-0.688163	2.00148
7.50000	1	42	1.0	42.0	-0.674532	2.01490
7.80000	3	45	3.0	45.0	-0.666977	2.05412
8.00000	2	47	2.0	47.0	-0.656384	2.07944
8.50000	1	48	1.0	48.0	-0.629902	2.14007
9.00000	5	53	5.0	53.0	-0.603420	2.19722
9.50000	1	54	1.0	54.0	-0.576938	2.25129
10.5000	1	55	1.0	55.0	-0.523974	2.35138
11.0000	2	57	2.0	57.0	-0.497492	2.39790
11.5000	2	59	2.0	59.0	-0.471010	2.44235
13.0000	4	63	4.0	63.0	-0.391563	2.56495
14.0000	1	64	1.0	64.0	-0.338599	2.63906
14.5000	1	65	1.0	65.0	-0.312117	2.67415

VARIABLE [IgA/Pt]

VALUE	FREQ	CUM FREQ	%	CUM %	% SCORE	[L-IgA] VALUE
15.0000	1	66	1.0	66.0	-0.285635	2.70805
15.5000	2	68	2.0	68.0	-0.259153	2.74084
16.5000	3	71	3.0	71.0	-0.206189	2.80336
17.0000	3	74	3.0	74.0	-0.179707	2.83321
18.0000	1	75	1.0	75.0	-0.126743	2.89037
19.0000	1	76	1.0	76.0	-7.37785E-02	2.94444
20.0000	2	78	2.0	78.0	-2.08143E-02	2.99573
22.0000	1	79	1.0	79.0	8.51140E-02	3.09104
25.0000	1	80	1.0	80.0	0.244007	3.21888
26.0000	1	81	1.0	80.0	0.296971	3.25810
27.0000	1	82	1.0	82.0	0.349935	3.29584
28.0000	2	84	2.0	84.0	0.455863	3.33220
29.0000	2	86	2.0	86.0	0.455863	3.36730
30.0000	1	87	1.0	87.0	0.508827	3.40120
31.0000	4	91	4.0	91.0	0.561792	3.43399
33.0000	2	93	2.0	93.0	0.667720	3.49651
35.0000	2	95	2.0	95.0	0.773648	3.55535
37.0000	3	98	3.0	98.0	0.879577	3.61092
38.0000	1	99	1.0	99.0	0.932541	3.63759
40.0000	1	100	1.0	100.0	1.03847	3.68888
41.0000	2	102	2.0	102.0	1.09143	3.71357
47.0000	1	103	1.0	103.0	1.40922	3.85015
51.0000	1	104	1.0	104.0	1.62108	3.93183
54.0000	1	105	1.0	105.0	1.77997	3.98898
56.0000	1	106	1.0	106.0	1.88590	4.02535
60.0000	1	107	1.0	107.0	2.09775	4.09434
64.0000	1	108	1.0	108.0	2.30961	4.15887
68.0000	2	110	2.0	110.0	2.52147	4.21951
74.0000	1	111	1.0	111.0	2.83925	4.30407
103.000	1	112	1.0	112.0	4.37521	4.63473

5.4.1. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar según el tipo de ésta.

Analizando los distintos tipos de Neoplasia Pulmonar que se estudiaron no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, así tuvimos que: el valor medio [IgA/Pt] en el subgrupo de Carcinomas Epidermoides ($X=26.85 \pm 20.18$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.98 \pm 0.85$ ug/ml), estaba aumentado respecto al valor medio de [IgA/Pt] encontrado en los Adenocarcinomas ($X=19.05 \pm 15.95$ ug/ml), ($X^*=3.44 \pm 0.06$ ug/ml), ($p < 0.40$) y respecto del valor obtenido en los Carcinomas anaplásicos tipo "oat cell" ($X=19.58 \pm 12.23$ ug/ml), ($X^*=2.53 \pm 0.87$ ug/ml) ($p < 0.20$). [Tabla XV] [Gráfico 6]

5.4.2. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar según presenten o no Cor Pulmonale Crónico como diagnostico asociado.

En el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar y Cor Pulmonale crónico asociado (2%) se obtuvo un valor medio de [IgA/Pt] ($X=22 \pm 13$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.87 \pm 0.68$ ug/ml) aumentado respecto al de pacientes con Neoplasia pero sin Cor Pulmonale ($X=20.61 \pm 16.32$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.76 \pm 0.84$ ug/ml). [Tabla XX] Dicho aumento no resultó estadísticamente significativo ($p < 0.20$). [Gráfico 7]

5.4.3. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar según tuviesen o no el hábito de fumar.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.25$) entre el valor medio de [IgA/Pt] ($X=19.97 \pm 9.7$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.6 \pm 0.79$ ug/ml), obtenido en los pacientes con Neoplasia Pulmonar y hábito de fumar, respecto del valor de [IgA/Pt] ($X=23.38 \pm 17.5$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.7 \pm 1.07$ ug/ml) obtenido en los pacientes tumorales no fumadores. [Tabla XXI] [Gráfico 8]

5.4.4. - Resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar que además presentaban sobreañadido un cuadro de E.P.O.C.

El valor medio de [IgA/Pt] encontrado en el subgrupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar asociada a E.P.O.C. (42.3%) fué ($X=25.21 \pm 18.07$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.85 \pm 0.96$ ug/ml) estando aumentado con respecto al grupo de pacientes con Neoplasia sin E.P.O.C. ($X=15.38 \pm 11.86$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.45 \pm 0.72$ ug/ml). [Tabla XX] Pero dicho aumento no fue estadísticamente significativo ($p < 0.10$) [Gráfico 9]

5.5. - Resultados obtenidos en la determinación de la [IgA/Pt] en el subgrupo de E.P.O.C. y en el de Neoplasias Pulmonares.

Entre el valor medio de [IgA/Pt] de los pacientes con Neoplasia Pulmonar ($X=20.74\pm 16.31$ ug/ml), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.65\pm 0.87$ ug/ml), y el valor medio en el grupo total de pacientes con E.P.O.C. ($X=20.58\pm 19.37$), [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.77\pm 0.83$ ug/ml), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.20$). [Tablas XIV y XV]
[Gráfico 10]

5.6. - Correlación entre niveles de [IgA/Pt] y los parámetros estudiados: Edad, Sexo, Tabaco, E.P.O.C-Cor Pulmonale, Neoplasia-Cor Pulmonale.

Se utilizó un sistema de regresión múltiple lineal para valorar el grado de correlación entre la variable dependiente aquí estudiada es decir la [IgA/Pt] y las variables independientes, (E.P.O.C., Cor Pulmonale Crónico, Edad, Sexo, Hábito de fumar y Neoplasia Pulmonar), que hemos considerado, como ya indicamos anteriormente, de posible influencia sobre el nivel de la [IgA/Pt].

TABLA XIII

CIFRAS DE [IgA] EN LOS SUJETOS CONTROL

MUESTRA: L.B.A.

<u>NO casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	1,1	0,09
2	6,5	1,87
3	4,5	1,5
4	3,1	1,13
5	4	1,38
6	3,8	1,33
7	7,5	2,01
8	5,8	1,75
9	2,4	0.87
10	1	0
11	2	0.69
12	5,5	1,7

CIFRAS DE [IgA] EN LOS SUJETOS CONTROL

MUESTRA: ESPUTO

<u>NO casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	1,1	0,09
2	6,7	1,9
3	4,7	1,54
4	3,1	1,13
5	4,02	1,39
6	3,8	1,33
7	7,7	2,04
8	5,8	1,75
9	2,4	0.87
10	1,03	0,02
11	2	0.69
12	5,5	1,7

TABLA XIV
CIFRAS DE [IgA] EN EL GRUPO TOTAL DE E.P.O.C.

<u>Nº Casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº Casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	3.1	1.13	40	31	3.43
2	41	3.71	41	64	4.15
3	103	4.63	42	13	2.56
4	14.5	2.67	43	35	3.55
5	29	3.36	44	17	2.83
6	9	2.19	45	3	1.09
7	28	3.32	46	6.8	1.91
8	16.5	2.8	47	4.8	1.56
9	18	2.89	48	29	3.56
10	31	3.43	49	74	4.3
11	8	2.07	50	27	3.29
12	7.8	2.05	51	28	3.33
13	38	3.63	52	54	3.98
14	16.5	2.8	53	6	1.79
15	31	3.43	54	5.7	1.74
16	37	3.61	55	11.5	2.44
17	13	2.56	56	68	4.21
18	7.4	2	57	9	2.19
19	3.8	1.33	58	14	2.63
20	7	1.94	59	47	3.85
21	3	1.09	60	20	2.99
22	5.2	1.64	61	15	2.7
23	33	3.49	62	7	1.94
24	7	1.94	63	56	4.02
25	6.3	1.84	64	40	3.68
26	7	1.94	65	11	3.39
27	17	3.29	66	16.5	2.8
28	25	3.21	67	9	2.19
29	7.8	1.02	68	4.6	1.52
30	7	1.94	69	5.2	1.64
31	15.5	2.74	70	9	2.19
32	6	1.79	71	4.9	1.58
33	15.5	2.74	72	4.2	1.43
34	6	1.79	73	17	2.83
35	3.8	1.33	74	7.4	2
36	13	2.56	75	11	2.39
37	3.6	1.28	76	19	2.94
38	8.5	2.14	77	22	3.09
39	3.7	3.51	78	37	3.61

TABLA XV

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON NEOPLASIA PULMONAR

<u>ADENOCARCINOMA</u>			<u>METASTASICO</u>		
<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	35	3.55	1	8	2.07
2	31	3.43			
<u>OAT CELL</u>			<u>EPIDERMOIDE</u>		
<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº casos</u>	<u>[IgA]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	26	3.25	1	15	2.56
2	31	3.43	2	51	3.93
3	30	3.4	3	41	3.71
4	9.5	2.25	4	60	4.09
5	3.7	1.3	5	9	2.19
6	6.3	1.84	6	10.5	2.35
7	7.8	2.05	7	4.2	1.43
8	5.8	1.75	8	33	3.49
9	11.5	2.44	9	20	2.99
10	37	3.61			

GRAFICO 3

[L-IgA] CONTROL vs PATOLOGICO

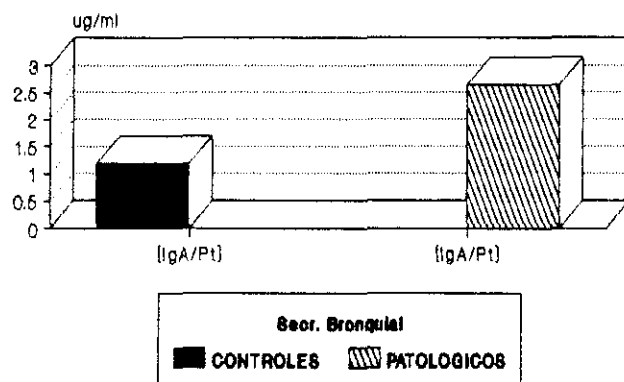
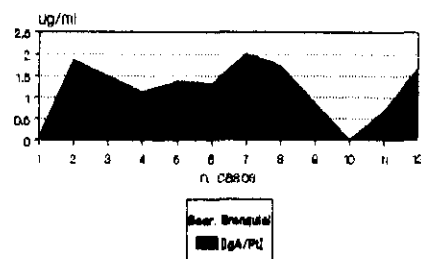


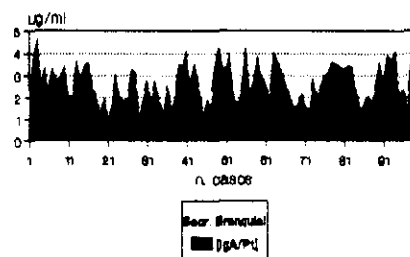
Grafico 3: Comparación de concentración media de IgA en:GRUPO CONTROL -PATOLOGICO expresada en [L-IgA] ug/ml

GRUPO CONTROL [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Grupo: CONTROL, expresados en transformada logarítmica

GRUPO PATOLOGICO [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Grupo: PATOLOGICO, expresados en transformada logarítmica

TABLA XVI

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON E.P.O.C.
SIN COR PULMONALE CRONICO

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/PT]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	103	4.63	24	3.7	1.3
2	14.5	2.67	25	35	3.55
3	2.67	3.36	26	17	2.83
4	9	2.19	27	3	1.09
5	16.5	2.8	28	3.1	1.13
6	8	2.07	29	41	3.71
7	7.8	2.05	30	28	3.33
8	31	3.43	31	18	2.89
9	37	3.61	32	31	3.43
10	13	2.56	33	38	3.63
11	7.7	2.04	34	16.5	2.8
12	3.8	1.33	35	7	1.94
13	3	1.09	36	7	1.94
14	5.2	1.64	37	6.3	1.84
15	33	3.49	38	25	3.21
16	7	1.94	39	7	1.94
17	17	2.83	40	6	1.79
18	7.8	2.05	41	31	3.43
19	15.5	2.74	42	64	4.15
20	3.8	1.33	43	13	2.56
21	13	2.56	44	6	1.79
22	3.6	1.28	45	15.5	2.74
23	8.5	2.14			

TABLA XVII

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON E.P.O.C.

Y COR PULMONALE CRONICO

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	6,8	1,91
2	28	3,33
3	5,7	1,74
4	14	2,63
5	47	3,85
6	20	2,99
7	56	4,02
8	4,6	1,52
9	9	2,19
10	7,4	2
11	11	2,39
12	19	2,94
13	4,8	1,56
14	29	3,36
15	74	4,3
16	27	3,29
17	54	3,98
18	68	4,21
19	11,5	2,44
20	68	4,21
21	9	2,19
22	15	2,7
23	7	3,13
24	40	3,17
25	11	2,39
26	16,5	2,8
27	9	2,19
28	5,5	1,7
29	4,9	1,58
30	4,2	1,43
31	17	2,83
32	22	3,09
33	37	3,61

GRAFICO 4

[L-IgA] E.P.O.C. vs E.P.O.C.+COR

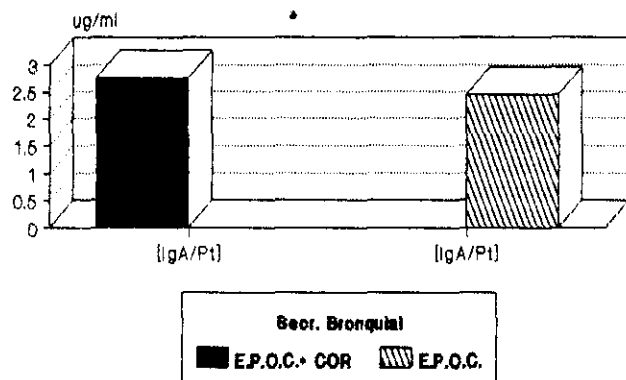
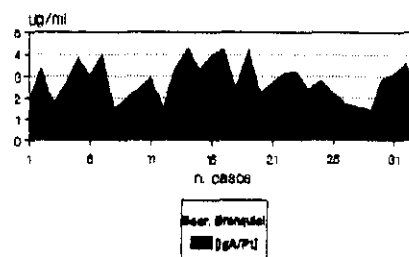


Grafico 4: Comparacion de concentracion media de IgA en Subgrupo: E.P.O.C.+COR-E.P.O.C., expresada en [L-IgA] ug/ml.

GRUPO E.P.O.C.+COR PULMONALE

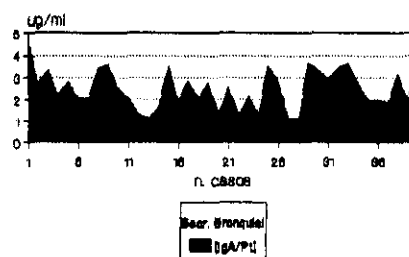
[L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: E.P.O.C.+COR, expresados en transformada logaritmica

GRUPO E.P.O.C.

[L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: E.P.O.C., expresados en transformada logaritmica

TABLA XVIII

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES NO FUMADORES

CON E.P.O.C.

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	3.1	1.13	20	29	3.36
2	41	3.71	21	74	4.3
3	28	3.33	22	27	3.29
4	18	2.89	23	54	3.98
5	31	3.43	24	68	4.21
6	38	3.63	25	11.5	2.44
7	16.5	2.8	26	9	2.19
8	7	1.94	27	15	2.7
9	7	1.94	28	7	1.94
10	6.3	1.84	29	40	3.68
11	25	3.21	30	11	2.39
12	7	1.94	31	16.5	2.8
13	6	1.79	32	9	2.19
14	31	3.43	33	5.2	1.64
15	64	4.15	34	4.9	1.58
16	13	2.56	35	4.2	1.43
17	6	1.79	36	17	2.83
18	15.5	2.74	37	22	3.09
19	4.8	1.56	38	37	3.61

TABLA XIX

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES FUMADORES

CON E.P.O.C.

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>	<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	103	4,63	21	13	2,56
2	14,5	2,67	22	3,6	1,28
3	29	3,36	23	8,5	2,14
4	9	2,19	24	3,7	1,3
5	16,5	2,8	25	35	3,55
6	8	2,07	26	17	2,83
7	7,8	2,05	27	3	1,09
8	31	3,43	28	6,8	1,91
9	37	3,61	29	28	3,33
10	13	2,56	30	5,7	1,74
11	7,4	2	31	14	2,63
12	3,8	1,33	32	47	3,85
13	3	1,09	33	20	2,99
14	5,2	1,64	34	56	4,02
15	33	3,49	35	4,6	1,52
16	7	1,94	36	9	2,19
17	17	2,83	37	7,4	2
18	7,8	2,05	38	11	2,39
19	15,5	2,74	39	19	2,94
20	3,8	1,33	40	68	4,21

GRAFICO 5

[L-IgA] E.P.O.C. vs E.P.O.C.+ FUMADOR

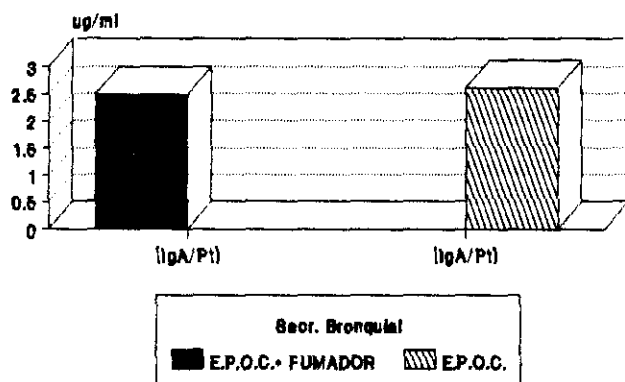
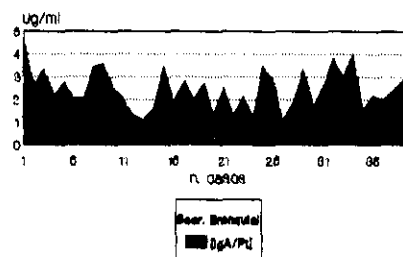


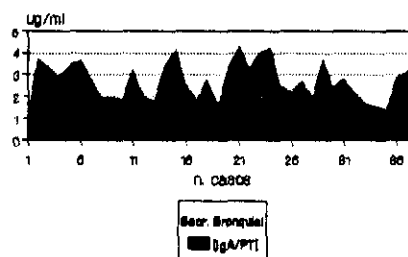
Grafico 5: Comparación de concentración media de IgA en el Subgrupo: E.P.O.C.- E.P.O.C.+ FUMADOR, expresada en [L-IgA]

GRUPO E.P.O.C.+ FUMADOR [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: E.P.O.C.+ FUMADOR, expresados en transformada logarítmica

GRUPO E.P.O.C.- NO FUMADOR [IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: E.P.O.C.- NO FUMADOR, expresados en transformada logarítmica

GRAFICO 6

[L-IgA] TIPO NEOPLASIA

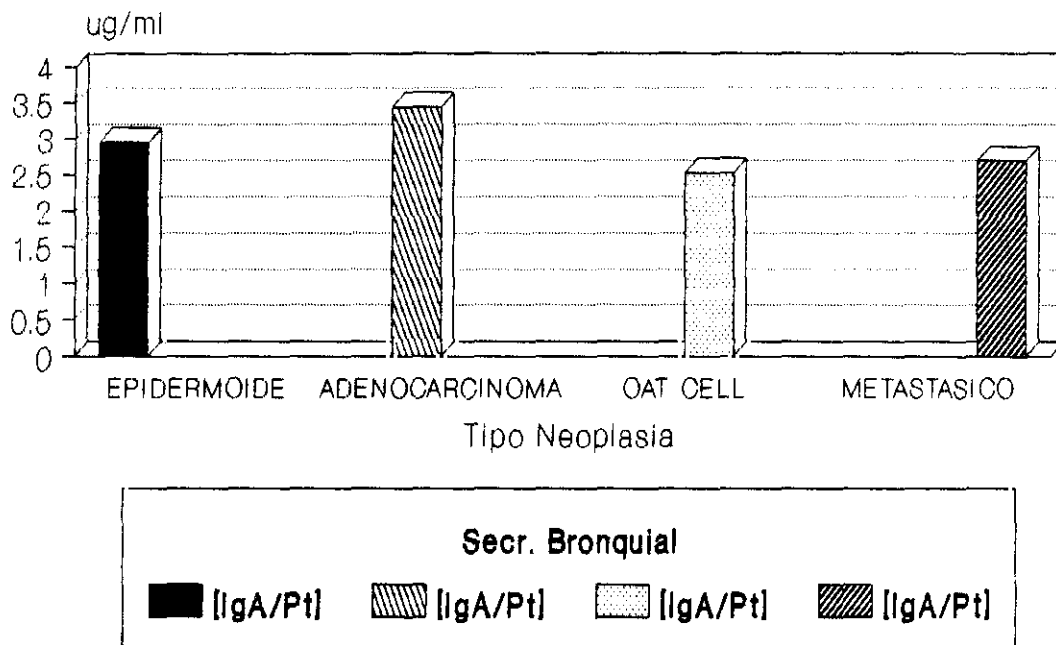


Grafico 6: Comparacion de concentracion media de IgA, según el tipo de Neoplasia Pulmonar, expresada en [L-IgA] ug/ml.

TABLA XX

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON NEOPLASIA PULMONAR

SIN COR PULMONALE CRONICO

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	31	3,43
2	26	3,25
3	31	3,43
4	30	3,4
5	9,5	2,25
6	3,7	1,3
7	6,3	1,84
8	7,8	2,05
9	5,8	1,75
10	11,5	2,44
11	37	3,61
12	13	2,56
13	51	3,93
14	41	3,71
15	60	4,09
16	10,5	2,35
17	4,2	1,43
18	33	3,49
19	20	2,99
20	8	2,07

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON NEOPLASIA PULMONAR

CON COR PULMONALE CRONICO

<u>Nº Casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	35	3.55
2	9	2.19

GRAFICO 7

[L-IgA] NEOPLASIA vs NEOPLASIA + COR

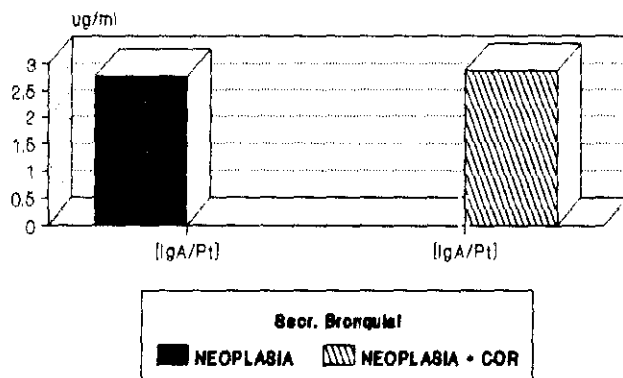
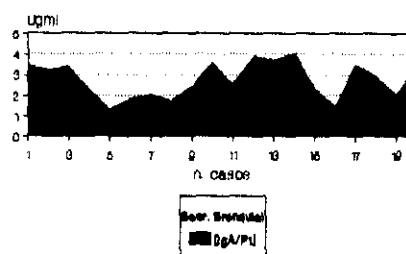


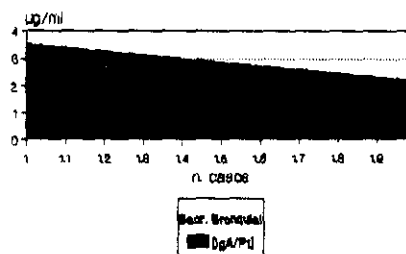
GRAFICO 7: Comparacion de concentracion media de IgA, en Subgrupo: NEOPLASIA + COR-NEOPLASIA, expresada en [L-IgA]

GRUPO NEOPLASIA - NO COR [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: NEOPLASIA - NO COR, expresados en transformada logaritmica

GRUPO NEOPLASIA + COR [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: NEOPLASIA + COR, expresados en transformada logaritmica

TABLA XXI

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES FUMADORES

CON NEOPLASIA PULMONAR

<u>Nº Casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	35	3.55
2	13	2.56
3	6.3	1.84
4	41	3.71
5	60	4.09
6	37	3.61
7	9	2.19
8	30	3.4
9	9.5	2.25
10	8	2.07
11	3.7	1.3
12	10.5	2.35
13	4.2	1.43
14	7.8	2.05
15	33	3.49
16	11.5	2.44
17	20	2.99

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES FUMADORES

CON NEOPLASIA PULMONAR

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/m</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	3.1	1.13
2	26	3.26
3	51	3.93
4	5.8	1.75
5	31	3.43

GRAFICO 8

[L-IgA] NEOPLASIA FUMADOR vs NO FUMADOR

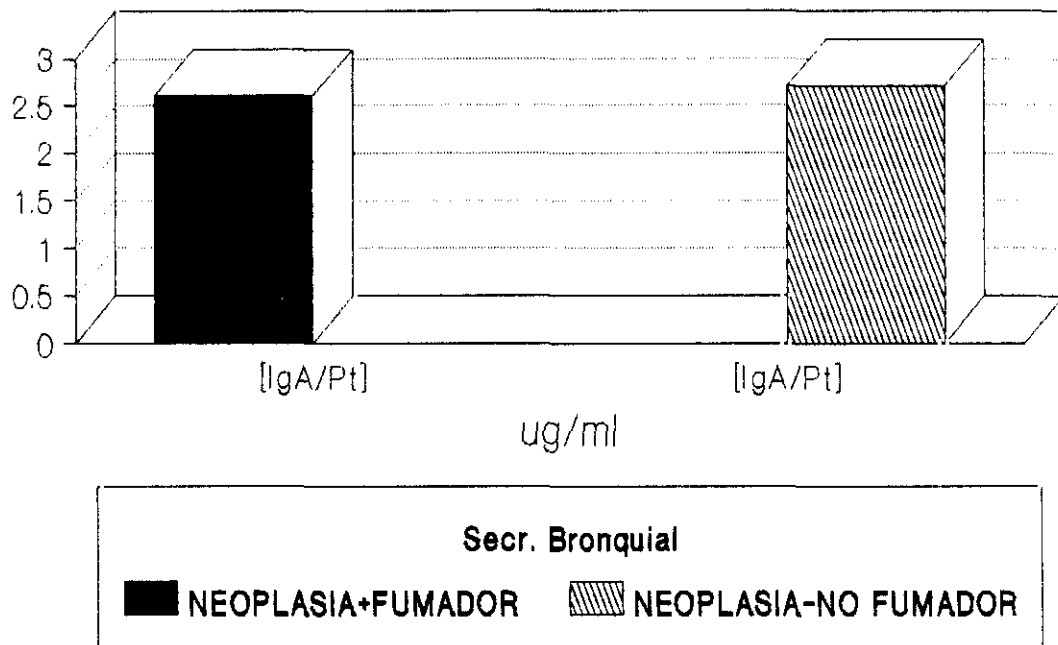


Grafico 8: Comparacion de concentracion media de IgA, en el Subgrupo: NEOPLASIA FUMADOR-NO FUMADOR, expresada en [L-IgA]

TABLA XXII

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON NEOPLASIA PULMONAR
Y E.P.O.C.

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	35	3,55
2	3,1	1,13
3	51	3,93
4	60	4,09
5	33	3,49
6	20	2,99
7	31	3,43
8	9,5	2,25
9	3,7	1,3
10	7,8	2,05
11	11,5	2,44
12	37	3,61

CIFRAS DE [IgA] EN PACIENTES CON NEOPLASIA PULMONAR
SIN E.P.O.C.

<u>Nº casos</u>	<u>[IgA/Pt]ug/ml</u>	<u>[L-IgA]</u>
1	13	2,56
2	41	3,71
3	9	2,19
4	26	3,25
5	30	3,4
6	8	2,07
7	6,3	1,84
8	10,5	2,35
9	4,2	1,43
10	5,6	1,72

GRAFICO 9

[L-IgA] NEOPLASIA+E.P.O.C. vs NEOPLASIA

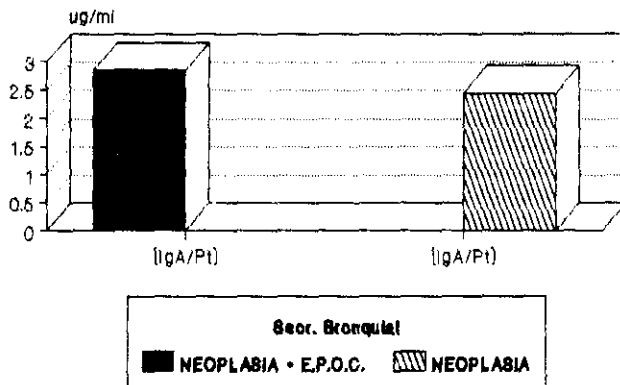
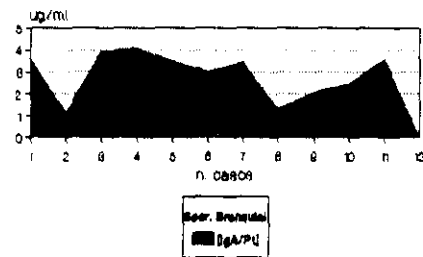


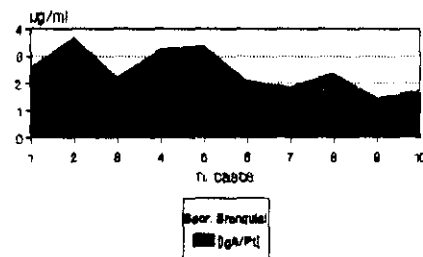
Grafico 9: Comparacion de concentracion media de IgA en el Subgrupo: NEOPLASIA+ E.P.O.C.-NEOPLASIA, expresada en [L-IgA]

GRUPO NEOPLASIA+E.P.O.C. [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: NEOPLASIA+E.P.O.C., expresados en transformada logaritmica

GRUPO NEOPLASIA [L-IgA]



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: NEOPLASIA, expresados en transformada logaritmica

Debido a los valores tan extraordinariamente amplios de la varianza, no se obtuvieron índices de correlación muy buenos entre las variables estudiadas.

A) Edad

Aunque no se consiguió un índice de correlación bueno entre la edad y el nivel de [IgA/Pt], se obtuvo un ajuste discretamente mejor en el subgrupo de pacientes afectos de E.P.O.C. ($r=0.09$) que en el grupo de pacientes con Neoplasia Pulmonar ($r=0.05$).

B) Sexo

En la muestra estudiada constituida por 97 varones y 15 hembras, no encontramos correlación entre el sexo y el nivel de [IgA/Pt], ni en el subgrupo de E.P.O.C. ni tampoco en el de sujetos con Neoplasia Pulmonar.

C) Hábito de fumar

Tampoco se objetivó correlación entre el nivel de [IgA/Pt] y el hábito de fumar en ninguna de las variables consideradas (E.P.O.C., Cor Pulmonale, Neoplasia Pulmonar, edad y sexo).

GRAFICO 10

[L-IgA] E.P.O.C. vs NEOPLASIA

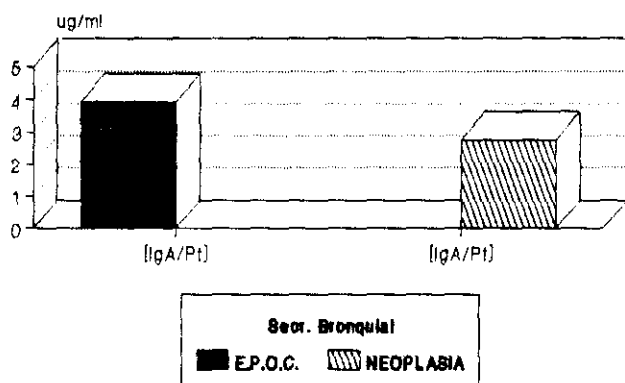
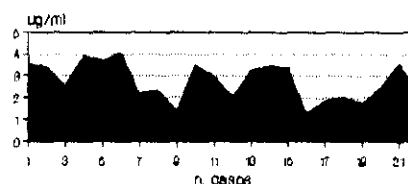


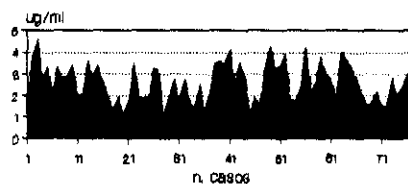
Grafico 10: Comparacion de concentracion media de IgA en el Subgrupo: E.P.O.C.-NEOPLASIA, expresada en [L-IgA]

GRUPO NEOPLASIA PULMONAR (L-IgA)



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: NEOPLASIA PULMONAR, expresados en transformada logaritmica

GRUPO E.P.O.C. (L-IgA)



Valores de [IgA/Pt] obtenidos en el Subgrupo: E.P.O.C., expresados en transformada logaritmica

D) E.P.O.C.-Cor Pulmonale

En ninguno de los dos grupos encontramos un índice de correlación bueno, a pesar de ello sí se observó que existía una correlación mejor entre los niveles de [IgA/Pt] y la presencia de E.P.O.C. asociada a Cor Pulmonale($r=0.12$), que en el grupo de pacientes en los que el cuadro de E.P.O.C. se presentaba solo ($r=0.08$).

E) Neoplasia Pulmonar-Cor Pulmonale

Tampoco encontramos una correlación buena entre los niveles de [IgA/Pt] en los sujetos con Neoplasia Pulmonar, tuvieran o no asociado un cuadro de Cor Pulmonale Crónico.

F) Neoplasia Pulmonar-E.P.O.C.

No se encontró, aquí tampoco, una buena correlación entre el nivel de [IgA/Pt] y la Neoplasia de Pulmón ($r=0.009$), aunque se encontraron correlaciones mejores, no buenas, cuando la Neoplasia incidía en sujetos que además presentaban un cuadro de E.P.O.C.

6. - DISCUSSION

6.- DISCUSION

6.1. - DISCUSION DEL METODO EMPLEADO

6.1.1. - LAVADO BRONCOALVEOLAR

Para la realización del Lavado Broncoalveolar mediante broncoscopia hemos seguido el método tal y como fue descrito inicialmente²⁴⁰, adoptando las modificaciones específicas recomendadas por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica en 1989²³⁷.

El lavado broncoalveolar se practica en el curso de una broncoscopia habitual. Realizamos esta exploración en una sala de quirófano contando en todo momento con equipo material y humano para reanimación cardiopulmonar. Afortunadamente esta medida no fue necesaria en ningún caso. Por el contrario la tolerancia fue buena.

La broncoscopia se practica con la premedicación, anestesia y técnicas habituales²³⁷. No administramos rutinariamente medicación ansiolítica, salvo algún caso excepcional por su potencial efector depresor del centro respiratorio.

Como liquido de lavado se emplea suero isotónico a temperatura ambiente. Algunos autores²⁴¹ aconsejan calentar el suero a 37°C para disminuir la tos; esta medida no parece imprescindible²³⁷. El volumen de liquido instilado varía, según los centros entre 100 y 500 ml²⁴², la mayoría de los autores recomiendan el empleo de 150-200 ml^{237,243,244}, nosotros hemos usado siempre 150 ml. Algún autor²²⁰ llama la atención por la mínima cantidad de fluido que utiliza para el LBA siendo ésta de 5 ml.

Después de la exploración completa del árbol traqueobronquial, se elige el bronquio en el que se va a hacer el lavado broncoalveolar; si hay secreciones se aspiran con cuidado de no hacer sangrar la mucosa. Nosotros elegimos un bronquio segmentario o subsegmentario del lóbulo medio o de la lingula, por ser en esta localización más fácil la recuperación del líquido instilado y por provocar una menor disminución de la PaO₂.^{6,220,237,245,246,247}

Seguidamente se encaja el fibroscopio y se instila el suero, en bolos de 50 ml con una jeringa de plástico adaptada perfectamente al canal de aspiración. Después de cada instilación esperamos unos segundos, dejando al enfermo respirar una o dos veces. Tras este brevísimo tiempo, aspiramos manualmente con la jeringa. Este método es sencillo y permite

variar la presión de aspiración según el flujo de líquido y el colapso que se observe en las paredes bronquiales.^{248,248,250}

Puede emplearse también una presión de vacío, que no debe sobrepasar los 80 mmHg (5 cm de agua)²³⁷, ya que se produciría colapso de la vía aérea con la consiguiente disminución del líquido recuperado.

El líquido recuperado se ha introducido en tubos de plástico siliconado estériles. Estos tubos numerados correlativamente según el orden de recogida, se han metido en hielo (4°C) y enviado, lo más rápidamente posible al laboratorio para su procesamiento.

Hemos desechado el líquido obtenido después de la instilación de los primeros 50 ml, por suponer que no proceden del territorio alveolar sino más bien de la vía aérea.²³⁷

A su llegada al laboratorio se procedió inmediatamente a su procesamiento. El contenido de los tubos se centrifugó a baja velocidad (200 g durante 15 minutos) y a 24°C, separándose en dos fracciones el sedimento celular y el sobrenadante. Una vez aislado el sobrenadante éste se congeló a -25°C hasta su procesamiento inmunoquímico.

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación del líquido del lavado broncoalveolar sin concentrar, fué descongelado a temperatura ambiente en el momento de su procesamiento.

La concentración del fluido obtenido del lavado broncoalveolar no parece necesaria ni conveniente ya que conlleva la pérdida total del moco^{11,237,246,251}, aunque algunos autores^{6,245,247} consideran que podría ser necesaria para evitar el efecto dilucional que sobre la concentración de la muestra recogida pueda tener el suero utilizado en el lavado.

Para la cuantificación de la IgA se utilizó el método de Inmunodifusión Radial Simple²²⁴.

6.1.2. - OBTENCION DE ESPUTOS

La obtención de las muestras de secreción broncoalveolar en el grupo de sujetos patológicos es decir, pacientes con E.P.O.C. y Neoplasia Pulmonar, se decidió hacer mediante la recogida del producto de expectoración profunda, debido al elevado número de alguna de las contraindicaciones^{252,253,254} existentes, en dicho grupo, para la realización de una broncoscopia, entre ellas cabe señalar:

1.- Falta e colaboración del sujeto.

2.- Presencia en algún caso de infarto de miocardio en los últimos seis meses anteriores a la realización de la prueba.

3.- Presencia de Cor Pulmonale crónico sobreañadidos a los cuadros de E.P.O.C. (42,3%).

4.- Presencia de un cuadro de infección bronquial aguda.

5.- Presión arterial de anhídrido carbónico (PCO_2) superior a 50 mmHg y/o presión arterial de oxígeno (PO_2) inferior a 65 mmHg, a pesar del tratamiento con oxígeno.

Esta última contraindicación es para algunos autores^{237,254} relativa, en nuestro estudio nosotros la hemos considerado como absoluta ya que algunos de nuestros pacientes presentaban un alto grado de hipoxemia, que podría haberse agravado más, a pesar del tratamiento con oxígeno, ya que durante el lavado broncoalveolar se produce un descenso en la presión de oxígeno de entre 5-20 mmHg, según autores^{253,254} debido a la ocupación de líquido en el alveólo durante la realización de esta maniobra exploratoria.

El esputo fue recogido de expectoración matutina, entre las 8 y las 10 horas, por ser esta la más demostrativa (27), previa limpieza de la cavidad oral con suero fisiológico para evitar el fenómeno dilucional que tiene la contaminación de la muestra por la saliva..

En los pacientes en que no fue posible la expectoración espontánea ésta se estimuló mediante la aplicación de nebulizadores con suero salino al 3-10%. Los primeros en utilizar este método fueron Bickerman et al²⁵⁵ mediante la utilización de una tecnica consistente en la inhalación de un aerosol producido por nebulización de *glicol-propileno* al 20% y clóruro sódico al 15%.

Revisada la bibliografia existente²⁵⁵ para la inducción de la expulsión del esputo los mejores resultados se consiguen con un aerosol de glicol-propileno al 15% y clóruro sódico al 10%.

Esta técnica se ha demostrado más eficaz y soportable en algunos de los pacientes, principalmente los más disnéicos, que las maniobras de percusión torácica repetida con las manos en copa²⁵⁶, o la utilización de vibradores mecánicos aplicados externamente²⁵⁶.

La técnica de estimulación por nebulización ultrasónica²⁵⁶ se ha demostrado más eficaz que los nebulizadores estándares, aunque en nuestro estudio no pudimos utilizarla por carecer de ella.

Los métodos más invasivos tales como la aspiración traqueobronquial deben ser usados cuando el paciente no puede cooperar por depresión del estado mental o incapacidad para toser.²⁵⁵ Estos métodos implican más peligros que la obtención espontánea o inducida de esputos, tales como lesión del epitelio, hemorragia mucosa, inducción del vómito con aspiración, apnea secundaria a estimulación refleja neural.²⁵⁶

Por término medio se obtuvieron muestras con un volumen de esputo de entre 5-10 ml, las cuales fueron recogidas en recipientes estériles de cierre hermético que se introducían para su conservación en hielo (4°C) y posterior traslado al laboratorio para su procesamiento.

Una vez en el laboratorio las muestras se procesaron tomando 3 ml de la muestra y 3 ml de suero fisiológico isotónico, para su homogeneización en el mortero de Potter. El problema técnico que se presenta en el fraccionamiento del esputo es su viscosidad, que impide el correcto pipeteo. Algunos autores²⁵⁶ han utilizado el fraccionamiento ultrasónico del moco bronquial

(20 K.cge. por seg. durante 2 horas) pero este procedimiento aunque es muy eficaz puede desnaturalizar las proteínas.

La acción de los agitadores mecánicos a veces basta para la preparación de las muestras, pero debe tenerse en cuenta sin embargo, que todos los métodos mecánicos de fluidificación aunque pueden disminuir la viscosidad, no aumentan necesariamente la solubilidad. De hecho después de estos tratamientos, las muestras con frecuencia se vuelven turbias.

Los procedimientos químicos de fluidificación del esputo se han estudiado durante bastantes años, en especial con la esperanza de conseguir agentes terapéuticos capaces de licuar las secreciones viscosas producidas en enfermedades pulmonares obstructivas crónicas.

Así tenemos por ejemplo el uso de *yoduros* y *enzimas proteolíticas*²⁵⁵, ambas sustancias producen su efecto licuefactante mediante la facilitación de la rotura proteolítica de las proteínas del esputo, bien directamente las segundas, o mediante la activación de las proteasas presentes en la muestra, *los yoduros*. Por ello ninguna de las dos técnicas tiene utilidad a la hora de analizar las sustancias proteicas de las secreciones bronquiales.

El material homogeneizado se centrifugó posteriormente a (200g, durante 15 minutos), quedando la muestra fraccionada en tres fases.

Con una pipeta Pasteur se recogió el sobrenadante y fué congelado a -25º C hasta su procesamiento inmunoquímico. No parece que dicho sobrenadante tenga que ser concentrado, dado que el efecto dilucional que sobre la muestra pueda tener la contaminación con saliva es mínima, si se sigue la técnica de limpieza de la cavidad bucal antes indicada.

La cuantificación de IgA se realizó mediante la técnica de Inmunodifusión Radial Simple.²²⁴ La determinación de proteínas totales se hizo mediante la técnica de Lowry.²³⁹

6.1.3. - INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

El problema principal en la determinación exacta de las inmunoglobulinas es la gran heterogeneidad del grupo²⁵⁷. Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases, alguna de ellas con subclases tal y como ocurre con el caso concreto de la IgA, de la que como ya hemos mencionado reiteradamente existen dos subclases. Además de las subclases la IgA presenta variaciones de tamaño, la forma monomérica es 7S pero es 11S en su estructura dimerica.

La determinación exacta de las proteínas monoclonales es difícil debido a que el antisuero del reactivo se prepara contra suero humano normal que contiene una mezcla de ambas subclases. Además la curva estándar se prepara empleando una mezcla de todas las subclases. Por otra parte las variaciones en tamaño e idiotípicas de los antígenos en este caso de la IgA, pueden permitir una reacción diferente entre una proteína monoclonal y el antisuero de un reactivo.

Para Daniel y otros²⁵⁸ la electrofóresis de las proteínas séricas proporciona una medición más exacta de las proteínas monoclonales que los métodos inmunoquímicos. Si bien estos últimos sobreestiman o subestiman la cantidad de proteína

monoclonal, pueden obtenerse resultados coherentes si en el seguimiento de cada paciente se utiliza el mismo método inmunoquímico.

De los métodos inmunoquímicos reseñados anteriormente, a recordar:

- . Inmunodifusión Radial Limitada o Cronometrada.
- . Inmunoprecipitación nefelométrica cinética o de punto final.
- . Electroinmunoanálisis, electroinmunodifusión de Laurell o técnica "Rocket".
- . El ensayo inmunofluorométrico y los sistemas turbidimétricos cinéticos

Los sistemas inmunofluorométricos tipo FIAX, los electroinmunodifusores y por turbidimetría cinética son utilizados por menos de 20 laboratorios según la encuesta del C.A.P (College of American Pathologists)¹¹.

El sistema FIAX²²⁶ presenta una buena correlación con los métodos de inmunodifusión radial y nefelométricos, aunque el coeficiente de variación es algo más alto que con respecto a otros métodos. Blanchard et al.²²⁶ determinaron que el tiempo

de un técnico para procesar 20 muestras para determinación de IgG, IgA e IGM por el sistema FIAx era de 4-5 horas, incluyendo el tiempo de incubación. Por su parte los equipos para inmunolectrodifusión por su elevado coste no se encuentra habitualmente en el comercio.

Los métodos turbidimétricos cinéticos llevados a cabo en analizadores centrífugos, tienen la ventaja de emplear instrumentos disponibles en muchos laboratorios. Sin embargo estas mediciones turbidimétricas son más difíciles debido a la gran cantidad de precipitado que se debe formar antes de observar una variación significativa en la absorbancia. La medición de diferencias pequeñas entre absorbancias grandes puede tener poca precisión.²⁵⁹

En la encuesta realizada por el C.A.P.¹¹ aproximadamente el 65% de los laboratorios encuestados utilizaban la técnica nefelométrica²⁵¹ y un 35% las técnicas de inmunodifusión radial simple (RID). El coeficiente de variación inter-laboratorios para la técnica nefelométrica es algo menor que para la inmunodifusión radial, sin embargo esta variación puede reflejar diferencias en las técnicas de lectura para la inmunodifusión entre los laboratorios y los técnicos.

Los coeficientes de variación inter-laboratorios obtenidos con ambos métodos son comparables, Blanchard y Gadner²²⁶ encontraron la siguiente precisión interseries de ensayos para el método de inmunodifusión radial: coeficientes de variación 4.4 a 7.1% para IgG, 2.3 a 3.7% para IgA y 5.0 a 6.9% para IgM.

Para técnicas de nefelometría se encontraron coeficientes de variación entre 1 y 11%.

Los coeficientes de correlación entre los diferentes métodos por nefelometría y RID son mayores de 0.9%.²⁶⁰

Los coeficientes de sensibilidad para las técnicas nefelométricas y de inmunodifusión Radial en la determinación de IgA son parecidos 0.5-3 ug/ml y 1-3 ug/ml, respectivamente.²⁶⁰

El tiempo de trabajo requerido por un técnico para las placas de inmunodifusión radial es de 2-3 minutos por muestra; el tiempo de trabajo requerido para la determinación por nefelometría depende del grado de automatización. Con un modelo muy básico el tiempo es parecido al necesario en las técnicas de inmunodifusión.²⁶⁰

El principal factor determinante a la hora de elegir entre los métodos por nefelometría o RID, es la cantidad de muestras a analizar, el primero de ellos es el de elección a la hora de procesar un gran lote de muestras mientras que la RID es el método de elección para pequeños lotes de muestras en los que además la demora en obtener los resultados no tenga importancia clínica.²³⁵

Por todo ello para la determinación cuantitativa de la IgA hemos seguido la técnica de Inmunodifusión Radial. En los estudios revisados en este trabajo un 8% de ellos utilizó la técnica nefelométrica, un 4% utilizó el método de inmunofluorométrico, otro 4% manejo la técnica de radioinmunoanálisis y un 82% utilizaron la inmunodifusión radial simple por técnica de Mancini.

Esta técnica basada en las reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo permite, mediante el estudio del halo de precipitación resultante de esa reacción inmunológica, determinar la concentración del antígeno, en este caso IgA, en estudio.

Se conocen dos tipos fundamentales de reacciones de inmunodifusión, la inmunodifusión simple o método de Mancini y la doble o método de Ouschterlony; en la primera de ellas uno

de los dos reactantes permanece fijo y el otro permanece libre, en un medio semisólido generalmente agar, formandose un halo o anillo de precipitación cuando ambos contactan, dicho halo de precipitación tiene como característica principal que el cuadrado de su diámetro es proporcional a la concentración del antígeno estudiado.

En el segundo tipo o método de Ouchterlony, ambos reactivos permanecen libres en la solución de agar desplazandose uno hacia el otro y formando igualmente un halo de precipitación cuyo grosor, al no mantener una relación lineal con la concentración del antígeno, sólo nos facilita una información cualitativa, de identificación antigénica y semicuantitativa, del antígeno estudiado.

Para la realización de nuestro trabajo hemos seguido la técnica de Mancini o Inmunodifusión Radial Simple, tal y como se describió anteriormente.

Una vez en el laboratorio las muestras de ambos grupos fueron descongeladas a temperatura ambiente. Durante el tiempo empleado para su procesamiento se mantuvieron a una temperatura entre 2-40 C, todo esto para evitar roturas moleculares de los distintos componentes bioquímicos.

En la preparación de las placas de inmunodifusión se ha seguido la normativa facilitada por el C.A.P.¹¹ (College of American Pathologists).

El gel de inmunodifusión utilizado ha sido el sistema Agarosa (2%) - EDTA (0.4 M) básicamente por dos razones:

- . Evita las conocidas propiedades de intercambio catiónico del agar hacia proteínas con migración catódica a pH: 7-8,6.

- . Impide la alteración de algunas seroproteínas.²³⁴

Existen dos formas conocidas²³⁴ de preparar una placa para inmunodifusión, en la primera la utilizada por nosotros, se vuelca el gel de agarosa caliente sobre la placa lisa para formar una película de 1-2 mm de grosor, los geles producidos de este modo son lo bastante uniformes para ser empleados en inmunodifusión.

La otra técnica consiste en formar soportes de gel mediante el laminado entre dos superficies lisas, las placas así conseguidas son más finas de 400-500 μ m pero por el contrario, ese menor espesor obliga a utilizarlas en atmósfera fría (4°C) y húmeda ya que son más proclives a una rápida deshidratación.

Los geles de agarosa se adhieren muy poco al vidrio por ello, es necesario preparar las placas antes de recubrilas, algunos autores²⁶¹ pretratan las placas cubriendolas con una solución de agar al 1% en NaCl 0.15 M, o con una solución de agar 0.5% en el mismo diluyente. Posteriormente las placas son secadas en estufa a 50°C.

Otros autores²⁶² prefieren pretratar las placas del siguiente modo: primero se limpian con detergente o jabón orgánico de forma que la superficie sea uniformemente humedecible, luego se las sumerge o se las frota con una solución caliente de agarosa al 0.2% en agua destilada, dejandolas secar posteriormente a temperatura ambiente.

Nosotros hemos utilizado esta segunda técnica por su mayor rapidez y sencillez.

Como reactivo se ha utilizado el Buffer de Glicina (0.1 M, pH 7.0 con Merthiolate 1:10.000 como preservador). La utilización del Merthiolate como preservador en lugar de la azida sódica que se utiliza comúnmente, evita la posibilidad de explosión de los compuestos de ésta última con sistemas de instalación de cobre o plomo.²³⁴

Otros autores²³² prefieren la utilización del Buffer de Veronal sódico con pH 8.4, el utilizado habitualmente en inmunoelectroforesis, adicionado también con Merthiolate 1:10.000.

Como suero de referencia estándar de IgA se utilizó la *Preparación Comercial de Referencia de la O.M.S.* para la IgA humana; cada ampolla de esta preparación de referencia contiene 100 unidades internacionales, equivalentes cada una de ellas a 14.2 microgramos de IgA.²³⁸ Se decidió la utilización de este estándar de referencia para evitar la gran disparidad de títulos y monoespecificidad existente en los sueros estándar procedentes de otras fuentes comerciales. En la revisión hecha en este estudio todos los laboratorios utilizaron como IgA estándar la Preparación estándar diseñada por la O.M.S, menos 2 de ellos que utilizaron IgA estándar obtenida de calostro humano.^{11,263}

Algunos autores^{6,219,264} han sugerido que estos factores son los que contribuyen a la falta de concordancia de los valores obtenidos cuando se utilizan placas de RID disponibles comercialmente.

La mezcla del antisuero con el gel de agarosa se hace calentando el antisuero a 56°C y enfriando el gel a la misma

temperatura, dado que a esta temperatura la mezcla es mas homogénea.²³²

Por lo que se refiere al antisuero nosotros utilizamos el suministrado comercialmente por (Mely Laboratories, Springfield, Virginia; Hyland Division Travenol Laboratories, Los Angeles, California) y homologado por la CAP¹¹. En los estudios revisados llama la atención la falta de un criterio uniforme a la hora de utilizar un antisuero estándar. Siendo el más utilizado el antisuero suministrado por (Hyland Laboratories, Los Angeles, California) (43%). En la tabla XXIII se reflejan los distintos antisueños usados en dichos estudios; todos ellos son específicos contra la fracción 11S de la IgA.

A continuación se deposita la mezcla en las placas pretratadas y se realizan los orificios de los pocillos de unos 2 mm de diámetro. Posteriormente se introduce en ellos la preparación estándar y problema para realizar la medición del anillo de precipitación. La ventaja²³² de colocar los reactantes en los pocillos es que se hallan, de inmediato y en su totalidad, en contacto con el gel de agarosa-antisuero agilizando con ello la velocidad de reacción.

La medición del anillo de precipitación puede hacerse en campo oscuro con un microscopio de disección, dado el carácter

opaco de los anillos, o puede realizarse mediante coloración de los mismos. Para esto último se procede de la siguiente forma: se lava el gel para liberarlo de las proteínas que no han intervenido en la reacción y de sales, se seca, fija y colorea, volviéndose a secar. De esta manera la placa se puede conservar muchos años en un lugar frío, oscuro y seco.

Un método²⁶⁵ típico consiste en lavar la lámina delgada de gel durante una hora en solución fisiológica y luego una hora más en agua destilada. La placa se cubre con una hoja de papel de filtro que se ha empapado en agua destilada, y esto se cubre con tres capas de papel absorbente y una placa de vidrio.

Sobre ésta última se coloca un peso de aproximadamente 500 g. (un vaso de precipitado con 500 ml de agua destilada) durante 15 minutos, luego de lo cual se quita el papel de filtro de la película deshidratada y se seca el gel al aire.

La tinción de la placa se realiza con algún colorante para proteínas como por ejemplo, *la doble coloración escarlata de croceína-azul de Coomassie* durante 30 minutos, se diferencia con ácido acético al 0.3%, se lava con agua destilada y se seca nuevamente al aire.

Para preparar la solución colorante se agita una mezcla de 250 mg de escarlata de croceína [Eastman Kodak] y 15 mg de azul brillante R [Sigma Chemical Co.] en 100 ml de ácido acético al 5% y ácido tricloroacético al 3% a alrededor de 60°C.

La utilización o no de las técnicas de coloración está en función del interés en conservar las placas de inmunodifusión, ya que a nivel de precisión en la lectura del resultado no tiene gran trascendencia.²⁶⁵

Las fuentes de error en los resultados de la técnica de Inmunodifusión Radial simple, según los estudios realizados por el C.A.P. en 64 laboratorios están basadas principalmente en¹¹:

- Derramamiento del antígeno o soluciones estándar fuera de los pocillos.

- Anillos demasiado pequeños o demasiado grandes, debido a un exceso de antisuero o de antígeno.

- Cavidades incompletamente llenas, esto suele ocurrir cuando se utilizan capilares para la distribución en lugar de las pipetas serológicas.

-Concavidades que contienen burbujas de aire, por una mala técnica de llenado.

-Concavidades de bordes irregulares, lo cual produce distorsiones en los anillos de precipitación.

-Placas conservadas demasiado tiempo lo cual por la evaporación del agar puede distorsionarlas.

-Gel de agarosa disparejo, por errores a la hora de cubrirlas o pretratarlas.

-Levantamiento de la agarosa al succionar con la pipeta Pasteur, lo cual permite que la muestra se filtre por debajo a través del fondo de la concavidad distorsionando la formación de anillos.

6.1.4. - TECNICA DE LOWRY

La determinación de las proteínas totales (Pt) en todas y cada una de las muestras se realizó ante el problema que, para la cuantificación de las sustancias presentes en las muestras estudiadas representa el fenómeno de dilución, pues se desconoce la proporción de saliva, de anestésico, de suero

instilado y de fluido alveolar en el líquido que se recupera con el esputo y con el lavado broncoalveolar.^{246,264,266}

Wiggins et. al.²⁴⁶ demostraron que cuando se estudia la concentración absoluta de IgA en distintas secreciones bronquiales, las obtenidas por esputo, por aspiración traqueal, o por lavado broncoalveolar, se producía un fenómeno de dilución creciente según se profundizaba en la toma de la muestra así, observaron que en las muestras obtenidas la concentración absoluta de IgA era mayor en el esputo que en el lavado broncoalveolar y esto era debido, como ya hemos dicho a la dilución que dichas concentraciones sufrían como consecuencia de la contaminación por el suero utilizado en el lavado, por el uso de los anestésicos, etc...

Para solucionar este problema se puede expresar la concentración de IgA en forma de cociente, en el que figure como denominador una sustancia que difunda fácilmente a las secreciones bronquiales (albúmina, urea, potasio) o que se añade al suero instilado en una concentración conocida (azul de metileno).

La albúmina por su síntesis extrapulmonar y su fácil cuantificación, es la proteína de referencia más utilizada.^{245,264} Sin embargo en los procesos inflamatorios

del tracto respiratorio este método puede llevarnos a subestimar la concentración.²⁴⁶ El potasio es poco empleado, ya que puede sufrir importantes modificaciones si existen fenómenos de destrucción celular concomitante, tal y como puede ocurrir en diversos procesos tumorales; tampoco con la urea se logra el fin perseguido.²⁶⁷

Por eso nosotros al igual que otros autores^{11,245} hemos empleado las proteínas totales como sistema de estandarización para evitar los problemas que a la hora de cuantificar la concentración de IgA ocasiona los fenómenos de dilución, ya que su cuantificación por el método de Lowry es sencilla y económica.

TABLA XXIII

Lotes de antisueros utilizados en Inmunoanálisis

Revisión

ANTISUERO

Falk et. al. [268]	(1972)	"Meloy Lab. Springfield"
Herbert et. al. [6]	(1974)	"Meloy Lab. Springfield"
Clarke C. W. [269]	(1976)	"Meloy Lab. Springfield"
Mandel et. al. [220]	(1976)	"Meloy La. Springfield"
Glenn et. al. [247]	(1977)	"Meloy Lab. Springfield"
Low et. al. [270]	(1978)	"Meloy Lab. Springfield"
Iglehart et. al. [219]	(1980)	"Calbiochem-Behring Calif."
Stockeley et. al. [263]	(1980)	"Immunodiagnostic Research University of Birmingham"
Lustig et. al. [221]	(1980)	"Inmunoquemia Lab. Argentina"
Afford et. a. [271]	(1980)	"Seward Lab. Calif."
Rankin et. al. [245]	(1982)	"Bio-Rad Corp. Richmond"
Wiggins et. al. [246]	(1984)	"Immunodiagnostic Research University of Birmingham"
Bauer et. al. [272]	(1985)	"Meloy Lab. Springfield"
Delacroix et al. [251]	(1985)	Sin especificar
Neffen et. al. [273]	(1986)	"Meloy Lab. Springfield"
Lemaire et. al. [274]	(1987)	Sin especificar
Rogoz et. al. [275]	(1987)	Sin especificar
Misiewicz A. [276]	(1988)	Sin especificar
Viramontes et. al. [11]	(1989)	"LC-Partigen Behring"
Weselius et. al. [277]	(1989)	"Bio-Rad Corp. Richmond"
Pisani et. al. [264]	(1990)	"Meloy Lab Springfield"
Chauhan et. al. [278]	(1990)	"Meloy Lab. Springfield"
Collado L.	(1991)	"Meloy Lab. Springfield"

6.2. - DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En el pulmón normal la inmunoglobulina que se encuentra en mayor concentración en las secreciones broncoalveolares es la IgA. Dentro del sistema IgA, la fracción más abundante en ellas la IgA 11S que viene a representar entre el 90-99% de la IgA presente en las secreciones.^{6,219,247,271}

Nosotros hemos encontrado en nuestro estudio que en condiciones normales la concentración de IgA/Pt en la secreción bronco-pulmonar se encuentra entre valores de (0.09-2.01 ug/ml) con un valor medio de ($\bar{X}=1.19\pm 2.01$ ug/ml)

El papel de la IgA presente en las secreciones de la vía aérea es primordialmente defensivo ya que interviene en los mecanismos inmunológico de tipo humoral a varios niveles, por ejemplo esta demostrado el efecto inhibidor que la IgA tiene sobre la capacidad de adherencia de los microorganismos al epitelio mucoso mediante su unión a los epitopes antigénicos de dichos organismos. En este sentido existen gran cantidad de estudios con *Haemophilus influenza*²⁷⁹, *Streptococo Pneumoniae*.²⁸⁰

A este nivel defensivo también se han descrito la existencia en células inflamatorias de receptores para la IgA que tal vez

promueven la destrucción de patógenos celulares, mediante fenómenos de citotoxicidad mediada por células IgA dependientes.^{147,148}

Aparte de estas funciones, igualmente se ha descrito la importancia de la IgA en el mantenimiento de las propiedades físico químicas del moco bronquial modificando según su concentración, los módulos de elasticidad y viscosidad de las secreciones mucosas broncoalveolares.⁷

En los fenómenos de inflamación mucosa la acción de la IgA, podemos decir que tiene un efecto dual, por un lado bloquea o limita los mecanismos de inflamación principalmente mediante el bloqueo competitivo de la acción activadora de la IgG del complemento, con lo cual reduce en parte el efecto nocivo que sobre las superficies epiteliales tienen los fenómenos inflamatorios.¹⁴⁷

Y por otro puede activar en cierta medida, la vía alternativa del complemento, con lo cual intervendría en mayor o menor grado en los fenómenos inflamatorios mucosos.¹⁴⁸

Existen estudios que confirman la existencia por parte de la IgA de una cierta misión de vigilancia inmunológica en la prevención de aparición de tumores. Así está demostrado²⁸¹ que

la deficiencia selectiva de IgA se puede asociar al desarrollo de sarcomas de células reticulares, al carcinoma de células escamosas del esófago y del pulmón. Estos enfermos suelen padecer de forma asociada enfermedades autoinmunes y procesos infecciosos.

La actividad inmunológica de la IgA en las secreciones mucosas se afecta considerablemente por influencias externas, como la dieta, la flora microbacteriana y las hormonas. Muchas reacciones inmunológicas se deterioran cuando un individuo está desnutrido^{11,277} y las que ocurren en los tejidos mucosos no son diferentes.

Por ejemplo la carencia de vitamina A o la falta de proteínas y calorías disminuye la eficacia con la cual se localizan los linfocitos en los tejidos mucosos²⁸². Diferentes microbios también pueden afectar directamente la regulación inmunológica mucosa. El lipopolisacárido es un mitógeno potente de células B y tiene varios efectos directos en las actividades de las células colaboradoras y supresoras del pulmón y del intestino.

A nivel pulmonar diversos factores externos pueden influir en la concentración de IgA en el moco bronquial, algunos como el tabaco^{6,247,270,271} actúan lesionando directamente la mucosa

bronquial, otros aumentando la difusión plasmática de IgA a la luz bronquial²⁸³ tal y como acontece en los cuadros de insuficiencia cardiaca o Cor Pulmonale Crónico, y algunos alterando o modificando la síntesis y el transporte de IgA, como ocurre con la edad.

En mayor o menor grado las respuestas inmunológicas mucosas y sistémicas son afectadas de manera espectacular por el ambiente externo. Más aún la conservación de la integridad fisiológica de las mucosas es compleja pero depende en parte de las respuestas inmunológicas locales.

El estudio de las cifras de IgA secretoria, puede valorarse en todas las superficies mucosas o secreciones del organismo, para éste estudio nos hemos centrado en las secreciones broncoalveolares ya que revisada la bibliografía existente, hemos encontrado poca información y muy contradictoria sobre las alteraciones que sufre la tasa de IgA en la secreción bronquial. Sí además la obtención y el estudio de las muestras puede hacerse mediante unas técnicas, el lavado broncoalveolar, el esputo y la RID, sencillas, económicas y de baja morbilidad, el terreno está abonado.

La técnicas de RID permiten la cuantificación de IgA en la secreción bronquial. La RID es una técnica sencilla, de bajo

coste e inócua, que nos facilita una información bastante exacta de la concentración de inmunoglobulina en estudio, en este caso la IgA, con un coeficiente de sensibilidad de 1-3 ug/ml, muy parecido al de otras técnicas de más elevado coste y aparataje más complejo como son la nefelometría y la turbidimetría.

Para determinar las variaciones en la tasa de IgA en los procesos broncopulmonares que más frecuentemente son motivo de consulta en el Servicio de Neumología de un Hospital General o de un Centro de Salud, como son las Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas (E.P.O.C.) y las Neoplasias Pulmonales primarias o secundarias, hemos sometido a estudio mediante la técnica de Inmunodifusión Radial simple por el método de Mancini, las 112 muestras de secreciones broncoalveolares obtenidas de otros tantos sujetos controles y patológicos.

Establecemos primero el vaslor medio de referencia para la tasa de IgA en el moco bronquial, a partir de las determinaciones realizadas en 12 sujetos sanos, sin evidencia de enfermedad broncopulmonar, calculando este valor con una seguridad del 95%.

Esto nos ha permitido comparar los resultados obtenidos en 100 sujetos con enfermedades broncopulmonares comunes, tales

como E.P.O.C. y Neoplasias Pulmonares, primarias y secundarias, determinando de este modo, los cambios en la concentración de IgA en la secreción bronquial que se producen en dichas enfermedades, tengan o no asociado otros procesos morbosos.

Hemos hallado que la concentración media de IgA en la secreción bronquial de los sujetos sin enfermedad broncopulmonar evidente es significativamente más baja que en el grupo de sujetos patológicos estudiados.

En el grupo control hemos obtenido un valor medio de concentración de [L-IgA/Pt] en secreción bronquial de $[X^*=1.19\pm 0.62 \text{ ug/ml}]$ y en el grupo patológico de $[X^*=2.65\pm 0.87 \text{ ug/ml}]$ con una $p < 0.05$.

Además la tasa de IgA se encontró elevada dentro por encima del valor medio, dentro del grupo patológico (enfermos con E.P.O.C. y/o Neoplasia Pulmonar) según tuvieran asociado un cuadro de Cor Pulmonale crónico, 35% de los casos patológicos, aunque dicha elevación no fue estadísticamente significativa.

Según se desprende de esta observación así como de la revisión de la literatura, la elevación de la tasa de IgA en la secreción bronquial es un marcador de posible patología pulmonar. La valoración de ésta variación en la concentración

de IgA podría ser de utilidad para una evaluación diagnóstica, pronóstica y con fines terapéuticos.

6.2.1. - Niveles de IgA en el moco bronquial de los sujetos control

En las personas sin enfermedad broncopulmonar presente, la concentración media de [L-IgA/Pt] encontrada fué de [$X^*=1.19 \pm 0.62$ ug/ml] en LBA y de [$X^*=1.20 \pm 0.63$ ug/ml], en esputo; no existiendo entre ambas una diferencia estadísticamente significativa.

Lo cual nos permite afirmar junto con otros autores 245,246,270,271, que tanto el esputo como el lavado broncoalveolar son técnicas válidas para la obtención de muestras destinadas al análisis de los fluidos bronquiales ya que el efecto dilucional, por anestésicos, sueros, etc...que se produce en ambos métodos, sobre la proporción media de IgA/Pt, en su fracción 11S, no afecta de forma significativa a los resultados obtenidos por ambas técnicas de toma de muestras.

Debido a la gran dispersión de valores obtenidos en las muestras vease tabla, se ha procedido a tomar la transformada logarítmica de dichos valores para conseguir un campo de

muestreo más uniforme y lineal, al igual que han hecho otros autores.^{6,11,220,221,247,251,264,267,272,278}

En la tabla XXIV se exponen los resultados obtenidos en la [L-IgA/Pt] en moco bronquial, fracción 11S, publicados por distintos autores.

Estos datos no se diferencian basicamente de los obtenidos por nosotros.

Sorprende por lo alto del valor el resultado obtenido por Viramontes et. al.¹¹, lo cual podría en parte explicarse por el distinto estándar de IgA utilizado en su trabajo, que fué obtenido de calostro humano; igualmente puede haber influido en el resultado el tipo de antisuero usado (LC-Partigen Behring Institute).

En los trabajos de Herbert⁶, Delacroix²⁵¹ y Pisani²⁶⁴, se utilizaron como estándar de dilución la albúmina ello podría justificar en parte los valores obtenidos, por lo que se refiere al antisuero utilizado, Pisani y Herbert utilizaron el mismo que nosotros, mientras que Delacroix no lo especifica, ambos motivos pudieran influir en los resultados obtenidos.

Mandel²²⁰ utilizó como factor de estandarización el potasio y como antisuero el mismo que nosotros.

En su estudio Lustig²²¹ realizó su trabajo sobre biopsias de mucosa bronquial por lo que obtiene valores de IgA absolutos y por lo tanto poco comparable con los nuestros.

Falk et. al.²⁶⁷ sobre un grupo control de 6 sujetos sanos obtuvo un valor de [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.89\pm 0.50$ ug/ml), utilizando como antisuero el Meloy Lab. Springfield, obteniendo las muestras por LBA.

Glenn et. al.²⁴⁷ utilizando antisuero de Meloy Lab. Springfield, obtuvo un valor medio de [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.21\pm 0.64$ ug/ml), en un estudio llevado a cabo con 55 sujetos sanos destinado a probar los efectos del tabaco sobre la concentración de IgA.

Los resultados obtenidos por Bauer et. al.²⁷² en su trabajo sobre determinación de IgA en el lavado broncoalveolar de 19 sujetos con sarcoidosis pulmonar dieron, un valor medio de concentración de [L-IgA/Pt] en los sujetos control 6, de ($X^*=1.15\pm 0.63$ ug/ml). La técnica de cuantificación fue igualmente la RID por el método de Mancini. El antisuero fué de Meloy Lab. Springfield.

Wesselius²⁷⁷ en un estudio sobre 10 sujetos controles sanos obtuvo un valor medio de [L-IgA/Pt] de ($X^*=1.12\pm 0.50$ ug/ml), utilizando como antisuero el Bio-Rad Lab. Richmond; las muestras se obtuvieron por lavado broncoalveolar.

Por último en los trabajos de Chauhan et. al.²⁷⁸ sobre las alteraciones de los niveles de inmunoglobulinas y complemento en las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, realizado sobre un total de 60 sujetos, 30 de ellos controles, se obtuvieron unos resultados de concentración media de [L-IgA/Pt] en esputo de [$X^*=1.14\pm 0.42$ ug/ml], muy parecidos a los obtenidos en nuestro grupo control. El que obtuviese valores inferiores a los nuestros puede ser debido al caracter de fumador de todos sus sujetos control. La técnica de cuantificación de la IgA fué igualmente el método RID de Mancini y el antisuero fue del mismo distribuidor comercial que el nuestro (Meloy Lab. Springfield).

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad y sexo en la concentración de IgA en las secreciones bronquiales, resultados similares han sido indicados por otros autores⁶. Por lo que no parece probable, en contra de los estudios de Waldman et. al.² que las hormonas sexuales influyan o afecten seriamente a la síntesis de IgA.

Así mismo los valores obtenidos según presentasen o no hábito de fumar fueron [$X^*=1.09\pm 0.62$ ug/ml] y [$X^*=1.29\pm 0.63$ ug/ml], respectivamente, lo cual parece indicar que el tabaco disminuye la concentración de IgA en el moco bronquial.

Resultados similares han obtenido otros autores como Herbert⁶, Glenn.²⁴⁷

Es conocido que el tabaco es uno de los factores más agresivos para la mucosa bronquial en relación a los cambios histológicos que produce en ella.²⁴⁷

Así por ejemplo se sabe que los hidrocarburos policíclicos aromáticos tales como el *benzopireno*, el *metilcolantreno* y el *dibenzantraceno*, son capaces a través de sus metabolitos activos producidos tras la acción del enzima *arilhidrocarbónhidroxilasa*, de reaccionar con la membrana de la célula epitelial y de introducirse en el núcleo de la célula uniéndose a su DNA y alterando todo el metabolismo celular y la estructura de la membrana.

Estas alteraciones²⁸⁴ afectarían entre otras cosas a la síntesis del componente secretor necesario para la secreción de la IgA y por lo tanto debería existir una disminución en la cifra de IgA en el moco bronquial de los sujetos fumadores, ya

que estaría aumentada su destrucción por acción por las enzimas proteolíticas presentes en las secreciones. La disminución de concentración de IgA obtenida en nuestro estudio no resultó estadísticamente significativa.

Por otro lado algunos autores han demostrado que en el lavado broncoalveolar de los sujetos fumadores existen mayor número de células que en los sujetos no fumadores⁶, pero ésta hiperplasia celular se debe sobretodo a la serie macrofágica ya que los linfocitos están disminuidos, resultados similares ha encontrado Glenn et al^{247,285}. Esta alteración celular podría contribuir a explicar la disminución de la tasa de IgA en las secreciones bronquiales de los sujetos fumadores.

De lo expuesto hasta aquí podemos afirmar que en nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas con respecto a la edad, sexo, y hábito de fumar ni con los resultados obtenidos por otros autores,^{247,272,277} en el valor medio de concentración de IgA del moco bronquial obtenido en el lavado broncoalveolar de nuestros sujetos control.

Por todo ello pensamos que el valor expresado puede ser considerado como parámetro de referencia para la concentración media de IgA en moco bronquial siempre y cuando, la metodología haya sido la descrita en nuestro estudio.

No significando que este valor de [L-IgA/Pt] ($X^*=1.19\pm0.62$ ug/ml) sea una cifra de normalidad estricta, sino que mantenemos que valores con una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) serán patológicos con una seguridad del 95%. Además hemos encontrado que existe una asociación significativa entre la alteración de dicha cifra y la existencia de patología broncopulmonar.

Mediante este valor de referencia podremos estudiar y conocer las variaciones que, las enfermedades broncopulmonares más frecuentes en la practica clínica producen en dicho valor.

Este trabajo se ha centrado en evaluar dichas variaciones en esos procesos broncopulmonales, asociados o no a otros cuadros patológicos.

TABLA XIV

Concentración de IgA en moco bronquial, en sujetos sanos

Revisión

	n casos	IgA ug/ml
Falk et. al. [267] (1972)	6	$X^*=1.89+/-0.50$
Herbert et. al. [6] (1974)	10	$X^*=0.61+/-0.09^+$
Mandel et. al.[220] (1976)	10	$X^*=1.68+/-0.41^{++}$
Glenn et. al. [247] (1977)	55	$X^*=1.21+/-0.64$
Lustig et. al. [221] (1980)	10	$X^*=0.96+/-0.57^{+++}$
Bauer et. al. [272] (1985)	6	$X^*=1.15+/-0.63$
Delacroix et al.[251] (1985)	13	$X^*=1.3 +/-0.58^+$
Viramontes et. al.[11] (1989)	10	$X^*=2.34+/-0.88$
Wesselius et. al.[277] (1989)	10	$X^*=1.20+/-0.50$
Pisani et. al. [264] (1990)	10	$X^*=1.33+/-0.50^+$
Chauhan et. al.[278] (1990)	15	$X^*=1.14+/-0.42$
Collado L. (1991)	12	$X^*=1.19+/-0.62$

+: estandarizado con albúmina
++: estandarizado con potasio
+++: estudio in vitro sin estandarizar

6.2.2. - Niveles de IgA en las enfermedades broncopulmonares estudiadas

Una vez establecido un valor de referencia de la concentración de IgA en el moco bronquial, parece más fácil y sencillo el manejo de las distintas neumopatías objetos de este estudio, sobre todo en el sentido de determinar cuando existe patología (permite reconocer su presencia patológica cuando se eleva por encima del valor de referencia) y quizás, en el de valorar la evolución de la enfermedad.

En nuestro estudio hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la tasa de [L-IgA/Pt], entre los sujetos control y los afectados de Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica o Neoplasia pulmonar primaria o metastásica. No encontrándose diferencias significativas entre ambos subgrupos patológicos.

6.2.2.1. [IgA/Pt] en moco bronquial: E.P.O.C.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica hay que entenderla como un síndrome que agrupa a una serie de entidades (Bronquitis Crónica, Enfisema, Bronquiectasias y asma), cuya característica común es la limitación crónica al flujo aéreo

que se objetiva mediante las pruebas funcionales respiratorias, en las que se demuestra una disminución del VEMS y del índice VEMS/FVC.

Como ya vimos anteriormente son conocidas algunas de las modificaciones que se producen en la composición bioquímica de las secreciones bronquiales de enfermos con patología pulmonar.

En relación con las E.P.O.C. varios autores han dosificado el nivel de IgA en el moco bronquial.^{11,246,219 220,263,268,273,275,276,277,278,287,288,289,290,291}

Llegados a este punto debemos recordar el doble origen de la IgA presente en las secreciones bronquiales, por un lado la transudación plasmática responsable principal de la IgA 7S presente en las secreciones y la producción local a cargo de las células plasmáticas presentes en la submucosa, responsables de la fracción 11S o dímica de la IgA.

Así mismo debemos mencionar que la fracción de IgA predominante en el moco bronquial es la 11S en una proporción de 90-99%, siendo la IgA 7S minoritaria y procedente en su casi totalidad del plasma.^{6,271}

En nuestro estudio hemos encontrado un valor de [L-IgA/Pt] de ($X^*=2.61\pm 0.88$ ug/ml) aumentado de forma estadísticamente significativa sobre el nivel de referencia de los sujetos control. Este resultado coincide plenamente con otros estudios previos.^{219,278,286}

En cuanto al origen de este aumento de IgA en moco bronquial nosotros coincidimos con la mayoría de los autores en que es debido a una hiperproducción local de IgA; en apoyo a esta idea tenemos en primer lugar, que en nuestro estudio hemos utilizado un antisuero específico contra la fracción 11S de la IgA (Meloy Lab. Springfield), con lo cual únicamente hemos detectado incremento de esa fracción inmunoglobulínica, cuyo origen es casi exclusivo de producción local dentro del pulmón.^{6,263}

En segundo lugar algunos estudios^{263,276,291,292} han demostrado que en las E.P.O.C. el incremento de IgA en las secreciones bronquiales es mayor que el producido en el suero en dichas enfermedades, lo cual hablaría más en favor de un aumento en la producción local de IgA, que de un fenómeno de transudación desde el plasma.

Como explicación a este aumento de la producción local de IgA en los cuadros de E.P.O.C., pensamos que puede ser debida a

un incremento de las células secretoras de IgA localizadas en la lámina propia de los tejidos mucosos bronquiales.

En este sentido Burnet et. al.²⁹³ en su estudio de biopsias de mucosa bronquial de sujetos con E.P.O.C. observó un aumento mediante técnica de inmunoperoxidasa, del número de células que contenían IgA, sobretodo de la subclases IgA2, respecto de los sujetos control. Siendo esta subclase de IgA la predominante en las secreciones bronquiales tal y como ya se indicó anteriormente en este trabajo.

Datos similares a los de Burnet los obtuvieron Winder y Von Fellenberg²⁹⁴ al estudiar las poblaciones celulares en la mucosa bronquial de caballos afectos de cuadros de E.P.O.C. en los que se observaba un importante incremento, respecto a los caballos control, en el número de células productoras de IgA situadas en la submucosa peribronquial.

De todos estos resultados se puede inferir que la causa última en el aumento de la tasa de IgA en el moco bronquial de los sujetos afectos de E.P.O.C. es debido a la fracción polimérica 11S o IgA secretoria, cuya producción está elevada debido al incremento del número de células productoras de la misma localizadas en la lámina propia de la mucosa bronquial.

En cualquier caso debemos investigar el origen de ese incremento celular para explicar de forma más adecuada las variaciones que en los cuadros de E.P.O.C., se producen en la concentración de IgA secretora. Una línea de investigación especialmente prometedora es el estudio de las alteraciones celulares en la mucosa bronquial a nivel del sistema inmunocompetente.

En resumen, es incuestionable el aumento de la concentración de IgA en los sujetos afectos de enfermedades broncopulmonares obstructivas crónicas respecto de los sujetos sanos y los escasos estudios contrarios a esta idea^{11,289} pueden ser debidos a variaciones en la técnica de estudio¹¹ o al tipo de muestra utilizada²⁸⁹. Por lo que éstas variaciones en la IgA podrían utilizarse una vez estandarizadas, como medidas de apoyo para el diagnostico y posible evaluación terapéutica en ese amplio espectro de enfermedades broncopulmonares que representan los cuadros de E.P.O.C.

A) [IgA/Pt] en moco bronquial: E.P.O.C.-Tabaquismo

En nuestro trabajo hemos estudiado un total de 78 sujetos con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica de ellos un 51,2% eran fumadores, entendiendo como tal aquel sujeto que en el

momento del estudio fumaba (la mayoría un promedio de 20 cigarrillos/día), siendo el 38% restante no fumadores.

En ambos grupos se obtuvieron unos valores medios de [IgA/Pt] de $\bar{x}=2.50\pm 0.89$ ug/ml y $\bar{x}=2.72\pm 0.86$ respectivamente. Ambos resultados superiores a los obtenidos en los sujetos control pero no existiendo diferencia estadísticamente significativa, dentro del mismo subgrupo de enfermos E.P.O.C. entre fumadores y no fumadores, aunque sí se noto una menor concentración de [IgA/Pt] en el subgrupo de fumadores.

Resultados similares han sido referidos en la literatura revisada.^{6,219,278} Es conocido, que el tabaco es uno de los factores etiopatogénicos más implicados en el desarrollo de las Enfermedades Obstructivas Crónicas, sobretodo en la bronquitis y el enfisema.

Desde el punto de vista fisiopatológico se ha demostrado que el humo del tabaco puede dar lugar a un aumento de las resistencias aéreas Comroe y Nandel²⁹⁵. El humo actúa sobre la distensibilidad pulmonar disminuyendola y también sobre los fenómenos de difusión gaseosa alterandolos; así mismo actúa paralizando la actividad ciliar.

Aparte de todas estas alteraciones el tabaco también puede alterar los mecanismos de perfusión pulmonar dando lugar a un aumento del espacio muerto fisiológico.²⁹⁵

Unos de los aspectos más interesantes en el orden fisiopatológico, lo constituye a nuestro juicio las alteraciones en la secreción mucosa bronquial, como consecuencia de la acción irritativa ejercida por el humo.

El humo del tabaco al igual que la polución aérea y la infección bronquial aumenta la secreción mucosa bronquial. Una característica de la bronquitis crónica es la hipertrofia de las glándulas mucosas, demostrada por Reid y observada por Field, que existe en la mucosa de los fumadores.

Esta hipercrinia se suele acompañar de una discrinia, pero su hecho más indudable es que este moco patológico, en contraposición al moco normal que tiene una acción bactericida, se comporta como un caldo de cultivo por lo que en los hipersecretantes bronquiales se encuentran germenos por debajo de la carina²⁹⁶ zona normalmente estéril.

Por otro lado además de esta sobrecolonización microbiológica del árbol bronquial, en los sujetos afectados de E.P.O.C. existen estudios como los de Yeager¹⁵, que han

demostrado alteraciones en la síntesis proteica a nivel de las células broncoalveolares como consecuencia del tabaco.

En este sentido ya comentamos anteriormente que los compuestos químicos como el *benzopireno*, presentes en el humo del tabaco son capaces a través de sus metabolitos activos producidos tras la acción del enzima *aril-hidrocarbónhidroxilasa*, de reaccionar con la membrana de la célula epitelial y de introducirse en el núcleo de la misma uniendose a su DNA para alterar la síntesis proteica.

Estas alteraciones en la síntesis de las proteínas de la membrana de la célula epitelial, afectarían al componente necesario para la secreción de la IgA, a la síntesis de mucinas y de sialomucinas, principalmente a estas últimas, presentes en el moco bronquial.

De todo lo expuesto hasta el momento, la menor cantidad de IgA en el moco bronquial de los sujetos fumadores se explicaría como la consecuencia de dos fenómenos distintos; por un lado esa disminución podría ser debida a una hiperdestrucción de dicha IgA a nivel bronquial secundaria a una deficiente resistencia de la IgA a la proteólisis de las enzimas bacterianas por defecto del componente secretor el cual a su

vez, estaría alterado debido al fallo en la síntesis proteica antes mencionado.

Por otro lado aparte de esa hiperdestrucción, la ausencia del componente secretor interferiría en la normal secreción de IgA en la superficie mucosa bronquial, lo cual acabaría de contribuir a la menor presencia de la misma, que nosotros y otros autores hemos encontrado en el moco bronquial de los sujetos fumadores afectados de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

En conclusión, en nuestro estudio hemos encontrado al igual que en la literatura revisada, una disminución en la concentración de IgA en el moco bronquial de los sujetos fumadores afectados de cuadros de E.P.O.C., respecto a los mismos sujetos no fumadores.

Dichas diferencias no son estadísticamente significativas y podrían ser explicadas por los mecanismos antes expuestos, aunque consideramos que deben hacerse nuevos estudios para asentar dicha hipótesis por lo que aquí nos atrevemos a dejar abierta una puerta para posibles nuevas líneas de investigación sobre el tema.

B) [IgA/Pt] en moco bronquial: E.P.O.C.-Cor Pulmonale Crónico

La hipertensión pulmonar causante de fallo ventricular derecho tiene una de sus orígenes más frecuentes en los cuadros de E.P.O.C.

La causa de esta hipertensión radica en la hipoxia alveolar y arterial habitualmente asociada a acidosis respiratoria que padecen estos sujetos. El origen de la hipoxia en la enfermedad obstructiva de las vías aéreas se debe los trastornos de la relación ventilación-perfusión, responsables últimos de la hipoxemia alveolar y la acidosis respiratoria que culmina en el Cor Pulmonale.

Desde hace tiempo se conoce que la hipoxemia alveolar provoca vasoconstricción en el pulmón.²⁹⁷ El trastorno hipoxémico puede llevar a vasoconstricción si es tan acusado como para bajar la PO_2 a menos de 60 mmHg.

La hipercapnia que conlleva la hipoventilación alveolar, no parece afectar directamente a las arterias pulmonales y sus efectos sobre el Ph arterial pueden ser compensados o minimizados por el consiguiente incremento en las concentraciones plasmáticas de bicarbonato; pero bien por

prolongarse la situación de hipoventilación y seguir aumentando la retención de CO_2 o bien, por fallo de la capacidad buffer del plasma aparece la acidosis que potencia los efectos vasoconstrictores de la hipoxia produciéndose mayores aumentos de las resistencias periféricas y mayor hipertensión pulmonar.

Ese aumento de las presiones vasculares pulmonares si es mantenido en el tiempo conducirá a una situación de fracaso del ventrículo derecho es decir a una situación de Cor Pulmonale.

El fracaso del corazón derecho termina acompañándose de una elevación de la presión en la aurícula izquierda que posteriormente repercutirá en los vasos pulmonares contribuyendo si cabe, a aumentar aún más la hipertensión pulmonar.

Existen varias hipótesis^{283,298,299,300} para intentar explicar el fracaso cardíaco izquierdo que se produce en estos cuadros de disfunción ventricular derecha, de todas ellas, hoy en día, la explicación más generalizada para la disfunción ventricular izquierda en los cuadros de enfermedad pulmonar obstructiva crónica parece ser la "*interdependencia ventricular*"²⁸³ ; es decir, en los pacientes con agrandamiento ventricular derecho el tabique interventricular se abomba en la cavidad ventricular izquierda aumentando la presión en dicha

cavidad, la cual de forma retrograda afecta a la aurícula izquierda causando la hipertensión auricular izquierda antes mencionada.

La hipertensión pulmonar facilitará la salida de agua y proteínas por aumento de la permeabilidad al interior del pulmón, todo ello en estas condiciones hace esperar un aumento en la concentración de IgA en el moco bronquial.

A este respecto en nuestro trabajo hemos encontrado 33 (42,3%) sujetos afectos de Cor Pulmonale los cuales presentaban una cifra de concentración de IgA de $X^* = 2.77 \pm 0.85$ ug/ml cifra superior a la encontrada en los 45 sujetos (57,6%) que no presentaban sobreañadido dicho cuadro de Cor Pulmonale cuyo valor fué de $X^* = 2.45 \pm 0.87$ ug/ml. Dicha diferencia no es estadísticamente significativa.

En cuanto a la posible explicación de este fenómeno debemos indicar que en la literatura revisada sólo hemos encontrado un trabajo²⁹⁹ que haya estudiado esta variable en la determinación de la tasa de IgA en el moco bronquial, habiendo obtenido valores parecidos a los nuestros.

Nosotros pensamos al igual que Brogan et al²⁹⁹ que dicho aumento, en este caso, sí podría estar relacionado con un

fenómeno de transudación plasmática que permitiera el paso de tanto la fracción 7S como la 11S desde el plasma a las secreciones bronquiales, debido a los fenómenos de hipertensión vascular antes mencionados y ocasionados por el mecanismo de *"interdependencia ventricular"*.

El que la diferencia encontrada no sea estadísticamente significativa pudiera ser debido a que en nuestro estudio únicamente hemos detectado las variaciones en la fracción 11S de la IgA, la cual por otra parte es minoritaria en la circulación sistémica, siendo su principal fuente de origen la producción local.

Podemos concluir a la vista de estos resultados, que no existe una diferencia significativa en la tasa de IgA en el moco bronquial de los sujetos afectados de E.P.O.C. tengan o no asociado un cuadro de Cor Pulmonale Crónico y que, la escasa diferencia existente a favor de los cuadros de Cor Pulmonale seguramente es debida a fenómenos de transudación plasmática de las fracciones 7S y 11S.

6.2.2.2 [IgA/Pt] en moco bronquial: Neoplasia Pulmonar

Las Neoplasias Pulmonares primarias y secundarias o metastásicas pueden clasificarse en benignas o malignas. De ellas las más importantes y representativas son las neoplasias primarias malignas de origen principalmente epitelial, por lo que también se las denomina carcinomas broncogénicos y, debido a que representan el 95% de todos los tumores pulmonares el término carcinoma broncogénico se ha hecho sinónimo de carcinoma o simplemente cáncer de pulmón.

Aproximadamente en Estados Unidos aparecen 150.000 nuevos casos de cáncer de pulmón³⁰¹. En cuanto al sexo la incidencia se incrementa rápidamente; en España,¹⁸³ respecto al sexo, la incidencia es de 1 caso en la mujer por cada 15 en el varón, en general se puede decir que la incidencia en la mujer va en aumento y posiblemente antes del año 2000 iguale a la del hombre.

La incidencia máxima del cancer de pulmón se da entre los 60-70 años, con un pico a los 60 años, disminuyendo luego paulatinamente y siendo raro que se presente antes de los 40 años.

En la clasificación de la O.M.S. hay seis variedades de tumores epiteliales malignos o carcinomas de los cuales, los más frecuentes son en esquema:

-.Carcinoma Escamoso: También denominado Epidermoide, se define como un tumor epitelial maligno que produce queratina y/o posee puentes intercelulares.

-.Adenocarcinoma: Tumor epitelial maligno con formación de moco y/o ácinos y/o túbulos y/o papilas. Su origen no está establecido con claridad ya que se postulan como probables las glandulas bronquiales, las células mucosecretoras bronquiales e incluso las células de reserva del epitelio bronquial.

-.Carcinoma de células pequeñas: Denominado anteriormente carcinoma indiferenciado o anaplásico de células pequeñas, es el tipo más peculiar de los carcinomas. Histológicamente existen tres variantes; Carcinoma de células en grano de avena "*oat cell*"; Carcinoma de células en grano de avena tipo intermedio y Carcinoma de células de avena tipo combinado. Estos tumores suelen segregar sustancias entre las que la ACTH y la calcitonina son de las más frecuentes.

-Carcinoma de células grandes: Tumor epitelial maligno compuesto por células de núcleo grande con nucleólo prominente y citoplasma amplio que confiere a la tumoración una morfología diferente a los tipos descritos anteriormente, por lo que este diagnóstico se ha de realizar por exclusión.

Por lo que se refiere a los tumores metastásicos que asientan en los pulmones, los carcinomas del intestino grueso constituyen la fuente más frecuente de metástasis pulmonares solitarias. Los nódulos múltiples en el parénquima pulmonar se deben la mayoría de las veces, a diseminación hematógena de un tumor maligno.

Las fuentes más habituales de nódulos metastásicos múltiples son los carcinomas de riñón y de mama, sin embargo cualquier neoplasia maligna en particular los sarcomas, pueden originar múltiples metástasis pulmonares.

En nuestro estudio hemos analizado un total de 22 neoplasias pulmonares de las cuales únicamente hubo una neoplasia secundaria o metastásica procedente de un carcinoma de intestino grueso, obteniéndose en dicho caso un valor [L-IgA/Pt] de ($\bar{x}=2.07$ ug/ml).

Por lo que respecta a las otras 21 neoformaciones, todas ellas eran de carácter primario y estaban distribuidas de la siguiente forma: 2 *adenocarcinomas* con una $X^*=3.44\pm 0.06$ ug/ml; 9 *carcinomas epidermoides* con una $X^*=2.96\pm 0.85$ ug/ml y 10 *carcinomas de células pequeñas tipo "oat cell"* con una $X^*=2.53\pm 0.87$ ug/ml.

El valor medio de [IgA/Pt] del conjunto de neoplasias primarias y secundarias fue de $X^*=2.77\pm 0.83$ ug/ml, siendo este valor superior a la concentración media de los sujetos control, existiendo entre ambos una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados similares a los nuestros han sido referidos por varios autores.^{219,220,277,221}

No está del todo claro, el por qué de este aumento en la concentración de IgA en moco bronquial de los sujetos afectados de neoplasia pulmonar. Como todos tumores las neoplasias del tejido pulmonar conllevan en mayor o menor grado, una desestructuración sobre el modelo normal del tejido pulmonar.

Por ello algunos autores²¹⁹ intentan explicar dicho aumento en la concentración de IgA como, una respuesta a los fenómenos de inflamación y desestructuración que sobre el epitelio

bronquial supone la aparición de una neoplasia, lo cual facilitaría la transudación de IgA desde la sangre a las secreciones pulmonares.

En contra de esta teoría tenemos varias circunstancias, por un lado no olvidemos que en nuestro estudio hemos realizado la determinación de la fracción 11S de la IgA, fracción mayoritariamente de producción local a nivel de las superficies mucosas y el aumento que nosotros hemos detectado en la concentración es pues debido a esta fracción lo cual nos orienta hacia un aumento en la producción local no en la transudación plasmática.

Por otro lado en los trabajos de Mandel²²⁰ en los que analizó, entre otras variantes, la tasa de IgA en sujetos con procesos inflamatorios benignos del pulmón y en sujetos con neoplasias pulmonares, observó que en ambos grupos se obtenían tasas de IgA superiores a las de los sujetos control y que a su vez las tasas obtenidas en los sujetos con neoplasias eran significativamente más altas que en los procesos inflamatorios benignos.

Así mismo este autor demostró que cuando se comparaban el valor de IgA en las secreciones del pulmón afecto de neoplasia con el pulmón sano, se encontraban cifras elevadas en el

primero, mientras que en el segundo se hallaban cifras dentro de la normalidad.

Resultados similares a Mandel los obtuvo Pissani et al²⁶⁴ afirmando igualmente que en los procesos inflamatorios benignos del pulmón se produce un aumento en la concentración de IgA al igual que ocurre en los procesos neoplásicos pulmonares, pero que en estos segundos el aumento es mayor.

En la literatura revisada únicamente Viramontes¹¹ expone resultados opuestos a los aquí explicados; en dicho trabajo obtiene valores de IgA mayores en sujetos con E.P.O.C. que en los afectados de neoplasia pulmonar. Así mismo, encuentra valores mayores de IgA en suero en los sujetos con carcinoma pulmonar que en el resto de sujetos con E.P.O.C. y controles.

En la revisión de su trabajo no especifica el motivo de estas variaciones ni tampoco la discordancia entre los valores obtenidos en suero y en secreción bronquial. Nosotros consideramos que esa divergencia en los valores obtenidos entre su misma serie y las de otros autores pudieran ser debidas a variaciones en las técnicas, en las muestras estudiadas, etc...

Como consecuencia de todo lo expuesto hasta aquí podemos afirmar que en los procesos tumorales broncopulmonares, se

produce un incremento estadísticamente significativo en la concentración de IgA en las secreciones bronquiales, respecto de los valores obtenidos en sujetos sanos.

Y pensamos con otros autores^{220,221,277} que dicho aumento se debe en una mínima parte, a los fenómenos de transudación plasmática secundaria a la inflamación que el proceso neoplásico ocasiona en la superficie mucosa broncopulmonar pero que, su principal origen radica en una respuesta inmunitaria del pulmón a un, hoy por hoy, desconocido antígeno producido por los tumores que asientan en el pulmón.

Todo ello nos hace pensar junto con Lustig²²¹, Wesselius²⁷⁷, Mandel²²⁰ e Iglehart²¹⁹, que la estandarización de la IgA en moco bronquial puede tener utilidad para el diagnóstico precoz del carcinoma pulmonar y su diagnóstico diferencial con otros procesos broncopulmonares de naturaleza benigna.

A) [IgA/Pt] en moco bronquial: Tipo de Neoplasia

En nuestro estudio hemos analizado los tres principales tipos de carcinoma broncopulmonar, el adenocarcinoma, el carcinoma de células pequeñas tipo "oat cell" y el carcinoma epidermoide, así con un caso de carcinoma metastásico procedente de un tumor madre situado en el intestino grueso.

Analizadas las cifras de concentración de IgA encontradas en dichas Neoplasias no hemos encontrado diferencias significativas; solamente queremos recalcar el mayor valor encontrado en los carcinomas Epidermoides respecto de los otros tipos.

En relación a estos resultados Iglehart et al²¹⁹ también encontraron en su estudio que las cifras más altas de IgA correspondían a tipo histológico Epidermoide mientras que, en los tumores tipo "oat cell" y metastásicos obtenían valores próximos a los de los sujetos control. Resultados parecidos en cuanto al predominio de los carcinomas Epidermoides son referidos por Lustig et al²²¹

Por contra Mandel et al²²⁰ refieren un mayor aumento de IgA en el tipo Adenocarcinoma, que en el Epidermoide pero al igual que en los casos anteriores estas diferencias no son estadísticamente significativas.

En todos los trabajos y en el nuestro también, llama la atención que tanto el carcinoma tipo "oat cell" como los carcinomas metastásicos aún teniendo valores superiores a los controles estos son los menos elevados; es más algún autor²¹⁹ ha encontrado que los carcinomas tipo "oat cell" tienen valores dentro del rango de la normalidad y que incluso los tumores

metastásicos no tienen diferencias con los valores normales de IgA.

El predominio de IgA en los carcinomas Epidermoides podría intentarse explicar por sus características biológicas, no olvidemos que los carcinomas Epidermoides bien diferenciados son los que muestran una respuesta más acusada por parte del huesped, encontrándose los islotes de células tumorales redodeados de fibroblastos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos etc... Es decir posee o está en contacto con gran cantidad de células inmunocompetentes que pueden en respuesta ese supuesto antígeno antes mencionado, incrementar la producción local de IgA.

Por lo que se refiere al hecho diferenciador de los carcinomas tipo "oat cell" y metastásicos algunos estudios²¹⁹ intentan justificar esta respuesta de IgA, indicando un origen no epitelial de los carcinomas tipo "oat cell" siendo sus células derivadas de tejido ectodérmico. Por ello llegan a afirmar que el aumento de IgA en las neoplasias pulmonares es privativo de los tumores primarios del pulmón y únicamente de aquellos de origen epitelial.

Dicha discusión sobre el origen celular de los tumores de células pequeñas tipo "oat cell" no puede hoy en día se

admitida, aceptandose que todos los tumores epiteliales del pulmón derivan del tejido endodermico.³⁰²

Nosotros consideramos que dichas variaciones son producto del distinto índice de respuesta inmunológica de dichos carcinomas al supuesto antígeno tumoral ya varias veces señalado.

En resumen, por lo que se refiere a las variaciones en la concentración de IgA en moco bronquial según el tipo de neoplasia existente podemos decir que, no existen diferencias significativas en uno u otro tipo histológico de carcinoma pulmonar y la diferencia existente entre ellos podría explicarse por una mayor o menor respuesta inmune a un supuesto antígeno tumoral, aspecto éste que debe ser confirmado con futuros estudios al respecto.

Pensamos que ésta también sería una interesante línea de investigación que podría, una vez estandarizada las cifras de IgA, ayudar al diagnostico histológico de las neoplasias pulmonares siempre y cuando, los análisis se hicieran con una metodología común en todos los laboratorios.

B) [IgA/Pt] en moco bronquial: Neoplasia-Tabaquismo

En las 22 neoplasias estudiadas en este trabajo un 22,72% afectaban a sujetos que carecian de hábito de fumar, mientras que un 77,27% asentaban en pulmones de sujetos fumadores.

Este dato no hace más que corroborar la íntima relación tantas veces descrita en la literatura médica, existente entre el tabaco y el carcinoma pulmonar. En la década de 1950 el estudio realizado por el British Doctors Study²⁸⁴ confirmó el aumento de riesgo de muerte por carcinoma de pulmón asociado al consumo de cualquier tipo de tabaco, sobre todo de cigarrillos. En 1979 el Report of the Surgeon General on Smoking and Health confirmó sin lugar a dudas la relación causa-efecto del consumo de cigarrillos respecto al cáncer de pulmón.³⁰³

No se ha identificado aún el componente o la mezcla de componentes del humo del tabaco responsables del carcinoma pulmonar. El humo contiene una mezcla muy compleja de componentes químicos como son los productos celulósicos, alquitrán, proteínas, hidratos de carbono, alcaloides, sustancias pépticas, hidrocarburos, ácidos grasos, esteroides y productos inorgánicos. Específicos del tabaco y no de otros

humos, es la nicotina que no tiene propiedades cancerígenas y los isoprenoides que tampoco la exhiben.

Las acciones cancerígenas en sentido estricto corresponden fundamentalmente a los hidrocarburos aromáticos y en menor grado a los fenoles. La mayoría de estos productos se encuentran en los alquitranes y en su destilación participan muy activamente las altas temperaturas que aparecen durante la combustión en el acto de fumar, las cuales pueden llegar hasta los 884° C.

En esquema las principales alteraciones que ocasiona el tabaco sobre el epitelio bronquial son: la pérdida de cilios; aparición de fenómenos de hiperplasia de las células basales; aparición de células atípicas, etc..., lesiones éstas que pueden acabar degenerando en una transformación neoplásica de la superficie bronquial.

Por lo que respecta a la síntesis de inmunoglobulinas en los sujetos fumadores con neoplasia pulmonar, algunos autores²⁴⁷ han encontrado que en este tipo de sujetos existe un claro aumento en la concentración de IgG en las secreciones bronquiales en los sujetos fumadores, respecto de los no fumadores, diferencia ésta que no pudieron encontrar en referencia a la IgA.

Comparando los sueros de ambos grupos de sujetos encontraron niveles iguales tanto de IgA como de IgG. Así mismo el ratio IgG/IgA en moco bronquial estaba incrementado en los sujetos fumadores pero ello es debido como ya indicamos, a esa mayor cantidad de IgG detectada en los fumadores.

De estos resultados se puede deducir por un lado que, el aumento de IgG en fumadores se debe a un fenómeno de síntesis local, más que a una transudación de la misma desde el plasma secundaria a la inflamación que el tabaco produce sobre la mucosa bronquial y por otro lado que en lo referente a la IgA no existían diferencias significativas entre fumadores y no fumadores.

Pudiera ser que este aumento en la concentración de IgG fuera en respuesta a algún antígeno producido o existente en el humo del tabaco que ocasionara una respuesta IgG específica

En nuestro estudio hemos encontrado un valor de IgA en moco bronquial de sujetos fumadores de $X^*=2.6\pm 0.79$ ug/ml ligeramente inferior al obtenido en los pacientes tumorales sin hábito de fumar el cual fue de $X^*=2.7\pm 1.07$ ug/ml. Estos resultados son comparables a otros estudios.^{219,277}

Como ya mencionamos anteriormente el tabaco y más concretamente alguno de los productos presentes en el mismo sobretodo hidrocarburos policíclicos aromáticos, tales como el *benzopireno*, el *metilcolantreno* y el *dibenzantraceno*, son capaces, a través de sus metabolitos activos producidos tras la acción del enzima *aril-hidrocarbónhidroxilasa*,³⁰⁴ de reaccionar con la membrana de la célula epitelial y de introducirse en el núcleo de la misma uniendose a su DNA y alterando todo el metabolismo y síntesis proteica celular y más concretamente el componente secretor de la IgA.

Este mecanismo junto con las alteraciones ya mencionadas en cuanto a la población celular recogida en el lavado broncoalveolar de los sujetos fumadores podrían explicar esa ligera disminución en la concentración de IgA en el moco bronquial de los sujetos fumadores, disminución que por otra parte no es estadísticamente significativa.

C3) [IgA/Pt] en moco bronquial: Neoplasia-Cor Pulmonale Crónico

El concepto de Cor Pulmonale debe aplicarse a todas las situaciones de sobrecarga de presión para el ventrículo derecho secundarias a hipertensión arterial pulmonar.

Cuando se produce el fallo cardiaco acaba incrementandose la presión en la aurícula izquierda y secundariamente en los capilares pulmonares.²⁹⁹

Tenemos pues que en las situaciones de Cor Pulmonale se produce un incremento, debido por una parte a la propia hipertensión pulmonar causante del fallo derecho y por otra al fallo de la aurícula izquierda, de la presión en los capilares pulmonares. Este aumento de presión vascular a nivel del pulmón facilita el paso de proteínas desde la circulación plasmática a las secreciones broncopulmonares.

Esta difusión plasmática puede afectar al paso de IgA desde el plasma al moco bronquial. Esta transudación afectaría tanto a la fracción 7S como la 11S de dicha inmunoglobulina.

Dicho mecanismo de transudación podría justificar el aumento encontrado en nuestro estudio en el grupo de sujetos afectos de carcinoma pulmonar asociado a un cuadro de Cor Pulmonale Crónico, en los cuales la cifra de IgA encontrada fué de $X^*=2.87\pm 0.68$ ug/ml estando incrementado respecto a los sujetos afectos de tumoración pulmonar pero sin patología del tipo Cor Pulmonale, $X^*=2.76\pm 0.84$ ug/ml.

Dicho aumento no es estadísticamente significativo, ello podría ser debido a que con nuestra técnica únicamente hemos detectado incremento de la fracción 11S y no olvidemos que es la fracción 7S la predominante en el plasma, por lo que no hemos podido detectar si a nivel de esta última fracción se produce una gran transudación desde el plasma a las secreciones bronquiales cuando coexisten fenómenos de hipertensión pulmonar.

Así mismo los valores obtenidos no son muy demostrativos ya que únicamente hemos tenido dos casos de Cor Pulmonale crónico en nuestro estudio de sujetos con carcinomas pulmonares, es decir un 9.09%, respecto a 21 casos no asociados a Cor un 90.9% por lo que esta estrechez en la muestra estudiada también puede influir en los resultados obtenidos haciendolos poco demostrativos.

En resumen en los cuadros de Neoplasia pulmonar en los que se asocian cuadros que cursan con aumento de la presión del árbol vascular pulmonar existe un aumento en la concentración de IgA, debido probablemente a fenómenos de transudación de dicha inmunoglobulina desde la circulación plasmática más que a fenómenos de síntesis local ya que, la diferencia encontrada al estudiar la fracción 11S no es estadísticamente significativa.

D) [IgA/PT] en moco bronquial: Neoplasia+E.P.O.C.

Otra de las variables analizadas en nuestro estudio, era la encaminada a valorar si la presencia asociada de un cuadro de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica junto a una Neoplasia Pulmonar, podría tener un efecto sinérgico sobre la tasa de IgA en moco bronquial; al unirse en dicha situación los dos mecanismos antes señalados en el origen del incremento de dicha inmunoglobulina en los casos en que ambas entidades aparecían por separado.

Es decir por un lado una mayor síntesis de IgA por el incremento de células productoras de la misma y por otro el incremento debido a la respuesta inmune ante la presencia de una tumoración en el árbol broncopulmonar.

En la literatura recogida no hemos encontrado ninguna referencia a dicha asociación por lo que únicamente nos referiremos a los datos obtenidos de nuestro estudio.

En este sentido hemos analizado los resultados obtenidos en 12 sujetos (15,38%) en los que se presentaba de forma concomitante una Neoplasia Pulmonar asociada a un cuadro de E.P.O.C.; en dicho grupo hemos encontrado una cifra de IgA de

$X^*=2.85\pm 0.96$ ug/ml, valor éste que se encontraba incrementado respecto al grupo de sujetos cuya enfermedad de base era una Neoplasia Pulmonar, 10 sujetos (45,45%) cuyo valor de IgA fue de $X^*=2.45\pm 0.72$ ug/ml.

Como puede observarse de los resultados obtenidos, se presenta un incremento de la concentración de IgA en el moco bronquial de los sujetos en los que se asocia una E.P.O.C. a un cuadro de Neoplasia Pulmonar, respecto del grupo en que ambas enfermedades se presentan por separado.

Estos resultados concuerdan con lo previsto según lo explicado anteriormente, pero al no haberse obtenido una diferencia estadísticamente significativa consideramos que éste apartado debe estudiarse de forma más profunda y específica en futuras investigaciones.

6.2.3. [IgA/Pt] en moco bronquial: E.P.O.C.-Neoplasia

Como ya mencionamos anteriormente los valores de IgA encontrados en el moco bronquial de los sujetos que presentaban cuadros de E.P.O.C. y/o Neoplasia pulmonar, $X^*=2.61\pm 0.88$ ug/ml y $X^*=2.77\pm 0.83$ ug/ml, fueron significativamente mayores que en el grupo control $X^*=1.19\pm 0.62$ ug/ml, debido a los motivos anteriormente explicado.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en ambos subgrupos patológicos entre sí, no se observan diferencias estadísticamente significativas; resultados similares han sido referidos por otros autores.^{11,277}

Ello nos hace pensar junto con dichos autores que los mecanismos implicados en el incremento de IgA en ambos grupos, poseen un muy parecido índice de respuesta que acaba manifestandose por un aumento en la concentración de IgA en moco bronquial respecto de los sujetos control; pero que éste aumento es practicamente el mismo sea cual sea la enfermedad de base que ha dado origen a dicho incremento en la inmunoglobulina estudiada.

Y así mismo, es de suponer que en ambas patologías broncopulmonares se mezclan los dos mecanismos descritos es decir, por un lado en los cuadros de Neoplasia pulmonar podría existir un aumento en el número de células secretoras de IgA que se sumaría a la respuesta inmune anteriormente señalada y por otro en los cuadros de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica al incremento de células productoras de IgA se añadiría un cierto grado de respuesta inmunológica ante la agresión que sufre la mucosa bronquial en dichos cuadros broncopulmonares.

6.2.4 [IgA/Pt] en moco bronquial: Edad y Sexo

En nuestro estudio hemos analizado un total de 112 casos correspondientes a sujetos adultos, de edades comprendidas entre los 40-90 años con una media de $(67 \pm 8,73)$, en cuanto a la distribución por sexos el 86,6% eran varones (97) y el 13,39% estaba formado por hembras (15).

En ninguna de ambas variables estudiadas hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, entre los distintos grupos estudiados lo cual coincide con los resultados encontrados por otros autores.^{11,267,277}

Estos resultados hablan en favor de la idea de que la síntesis y producción de IgA en las secreciones bronquiales no se afecta en función ni de la edad ni del sexo, ni de que tampoco existe una correlación entre dichas variables y la concentración de IgA en el moco bronquial de los grupos estudiados, tanto controles como patológicos..

7. - CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

Después de realizar las 112 determinaciones de la tasa de IgA en el moco bronquial a otros tantos sujetos, unos controles y otros afectados de ese amplio espectro de enfermedades broncopulmonares que constituyen los cuadros de E.P.O.C. y las Neoplasias Pulmonares primarias y/o metastásicas, estamos en condiciones de poder concluir que en este contexto:

1.- La Inmunoglobulina IgA, se encuentra de forma constante en las secreciones bronquiales, sobretodo su forma dimérica o fracción 11S.

2.- El método más adecuado para evitar los errores, que en la determinación de la concentración de IgA en moco bronquial, produce el efecto dilucional de las secreciones y fluidos utilizados para dicha determinación, es la estandarización mediante el ratio IgA/proteínas totales [IgA/Pt].

3.- Que aplicando el ratio de estandarización IgA/Pt, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores de IgA de las muestras obtenidas por lavado broncoalveolar o por expectoración profunda.

4.- En los sujetos control hemos obtenido una concentración media de IgA [L-IgA/Pt] de $X^*=1.19\pm 0.62$ ug/ml ; en pacientes afectos de E.P.O.C. una [L-IgA/Pt] de $X^*=2.61\pm 0.88$ ug/ml; y en pacientes afectos de Neoplasias pulmonares primarias y/o metastásicas de $X^*=2.77\pm 0.83$ ug/ml.

5.- Que en los sujetos control, que consideramos como sanos, la concentración de IgA en el moco bronquial es significativamente más baja que en los sujetos afectos de enfermedades broncopulmonares del tipo E.P.O.C. y/o Neoplasia Pulmonar primaria o metastásica.

6.- La concentración de IgA en moco bronquial está aumentada de forma estadísticamente significativa en los sujetos afectos de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, respecto del grupo Control.

7.- Que en los pacientes afectados de Neoplasia Pulmonar la IgA en moco bronquial está, de forma estadísticamente significativa, incrementada respecto de los sujetos controles.

8.- Que no existe diferencia estadística, significativa, entre los valores de IgA en moco bronquial de los sujetos afectados de E.P.O.C. y/o Neoplasia pulmonar.

9.- Que la asociación de cuadros de E.P.O.C. y Neoplasia Pulmonar, tiene un efecto sinérgico en cuanto a la elevación de la IgA en moco bronquial, pero éste efecto no es estadísticamente significativo.

10.- Que el aumento de IgA en el moco bronquial en los cuadros de E.P.O.C. y Neoplasia Pulmonar, se debe a un incremento de la síntesis local de dicha inmunoglobulina más que a un fenómeno de transudación plasmática.

11.- Que el incremento en la síntesis local de IgA en los cuadros de E.P.O.C. y Neoplasias Pulmonares afecta principalmente a la fracción dimérica o fracción 11S de dicha inmunoglobulina.

12.- Que en los sujetos afectados de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica dicho aumento en la síntesis local de IgA podría deberse al incremento en el número de las células productoras de IgA localizadas en la mucosa bronquial.

13.- El incremento de la síntesis local de IgA en los pacientes afectados de Neoplasia Pulmonar, parece ser debido al resultado de una respuesta inmune del pulmón contra un, hoy por hoy, desconocido antígeno producido por los tumores broncopulmonares.

14.- El hábito de fumar parece disminuir la concentración de IgA en el moco bronquial de todos los grupos estudiados, si bien esta disminución no es significativa.

15.- Dentro de las Neoplasias Pulmonares el tipo histológico Epidermoide, muestra valores más altos de IgA que los otros tipos, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

16.- En la muestra estudiada no se ha encontrado ninguna correlación estadísticamente significativa entre la edad, el sexo y la concentración de IgA en el moco bronquial, en ninguno de los grupos estudiados.

8. - BIBLIOGRAFIA

8. - BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tomasi TB., Tan Em., Solomen A., Prendergast RA.: "Characteristics of an immune system common to certain external secretions". J. Exp. Med. 1965; 121:101-124.
- 2.- Mestecky J., McGheen JR.: "Immunoglobulin (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response". Adv. Immunol. 1987 40:153-245.
- 3.- Bienenstock J., Befus AD., "Mucosal immunology". Immunology. 1980; 41:249-255.
- 4.- Salmon S.: "Myeloma and related disorder". Clin. Lab. Haematol. 1982; 11:1.
- 5.- Colman PM.: "Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition". Adv. Immunol. 1988; 43:99-132.
- 6.- Reynolds HY., Nwball HH.: "Analysis of protein and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage". J. Lab. Clin. Med. 1974; 559-573.
- 7.- Puchelle E., Jacqot J, Zahn JM.: "In vitro restructuring effect of human airway immunoglobulin A and lysozyme on airway secretions". Eur. J. Respir. Dis. Suppl. 1987; 153:117-22.
- 8.- Daniele RP.: "Immunoglobulin secretion in the airways" Ann. Rev. Physiol. 1990; 52:177-195.
- 9.- Lopez-Vidriero MT.: "Mucus as a natural barrier". Respiration. 1989; 55 Suppl. IP. 28-32.

- 10.- Lopez-Vidriero MT.: " Airways Mucus". Chest. 1981; Suppl. 80:799-803.
- 11.- Remier CB.: "Collaborative calibration of the U.S. and the College of American Pathologists preparations for specific serum proteins". Am. J. Clin. Pathol. 1982; 77:12-19.
- 12.- Brothwell D., Sandison AT.: "Diseases in antiquity: A survey os the diseases and surgery of early populations". Springfield III; Charles C. Thomas 1967.
- 13.- Albert S., Lyons R., Petrucelli J.: "Medicine: ann illustrated history". Ed. Harry N. Abhrams. incorporated New York 1978.
- 14.- Tomasi Tb Jr.: " Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces". Rev. Infec. Dis. 1983; Suppl. 3: S784-792.
- 15.- Yeager H.: "Tracheobronquial secretions". Am. J. Med. 1971; 50:493.
- 16.- Blasi A., Olivieri D.: "La hipersecreción bronquial" Ed. Mayo 1983; 19.
- 17.- Breeze RG., Wheeldon EB.: "The cell of pulmonary airways". Am. Rev. Respir. Dis. 1977; 116:705-777.
- 18.- Crapo JD., Barry BE., Bachofen M.: "Cell numbers and cell characteristics of the normal human lung". Am. Rev. Respir. Dis. 1982; 126:332-337.
- 19.- Soderberg M., Hellstrom S., Sandstrom T., Lungren R., Bergh A.: "Structural caracterización of bronchial biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study". Eur. Respir. J. 1990; 3:261-266.

- 20.- Johnston WW., Frable WJ.: "The cytopathology of the respiratory tract: a review". Am. J. Pathol. 1976; 84:372-414.
- 21.- Basbaum CB.: "Regulation of airway secretory cells". Clin. Ches. Med. 1986; 7:231-237.
- 22.- Boat TF., Cheng PW.: "Biochemistry of airway secretions". Fed. Proc. 1980; 39:3067-3074.
- 23.- Rhodin J.A.G.: "Ultraestructure and function of the human tracheal mucosa". Am. Rev. Respir. Dis. 1966; (suppl.) 93.
- 24.- Wheater PR., Burkitt HG., Daniel VG.: "Functional histology". Churchill Livingstone Edinburgh 1987; 2^a Ed.:70-71.
- 25.- Strum JM., Singh G., Katyal SL., McDowell EM.,: "Immunochemical localization of Clara cell protein by light and electron microscopy in conducting airways of of fetal and neonatal hamster lung". Anat. Rec. 1990; 227:77-86.
- 26.- Hook GE., Brody AR., Cameron GS., Jetten AM., Gilmore LB., Nettesheim P.: "Repopulation of denuded tracheas by Clara cells isolated from the lungs of rabbits". Exp. Lung. Res. 1987; 12:311-29
- 27.- Zeltner TB., Caduff JH., Gehr P., Pfenninger J., Burri PH.: "The posnatal development and growth of the human lung".II. Model and method. Respir. Physiol. 1970/71; 11:54-75
- 28.- Bucher U., Reid L.: "Development of the mucus-secreting elements in human lung". Thorax 1961; 16:219-225.
- 29.- Weibel ER.: "Morphometry of the Human Lung". Springer Verlag Heidelberg 1963.

- 30.- Al-Bazzaz FJ.: "Regulation of salt and water transport across airway mucosa". Clin. Chest Med. 1986; 7:259-72
- 31.- Shimura S., Sasaki T., Ishihara H. Satoh M., Masuda T., Sasaki H., Takishima T.: "Airway hyperresponsiveness and mucous secretion". Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 1990; 28:1299-304
- 32.- Nadel JA., Widdicombe JH., Peatfield AC.: "Regulation of airways secretions, ion transport and water movement". in Fishman AP., Fisher AB., (eds): Handbook of Physiology, sect 3: The Respiratory System, vol 1: Circulation and Nonrespiratory Functions. Bethesda, American Physiological Society.1985; 419-445.
- 33.- Ohata M., Irako M.: "Regeneration of the respiratory epithelium". Hum. Cell. 1991; 4:204-211.
- 34.- Nadel JA.: "Role of mast cell and neutrophil proteases in airway secretion". Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144: S48-S51.
- 35.- Pryjma J., Herman T., Zebrak J., Gawe J., Herman S., Scislicki A.: "Studies of bronchial secretion. The Influence of inflammatory response and bacterial infection". Ann. Allergy. 1985; 54:60-64.
- 36.- Sommerhoff CP., Finkbeiner WE.: "Human tracheo-bronchial gland cells in culture". Am. J. Cell. Mol. Biol. 1990; 2:41-50.
- 37.- Reid L., Bhaskar KR.: "Macromolecular and lipid constituents of bronchial epithelial mucus". Symp. Soc. Exp. Biol. 1989; 43:201-219.

- 38.- Logun C., Mullol J., Rieves D., Johnson C., Miller R., Goff J., Kaliner M., Shelhamer J.: "Use of a monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to measure human respiratory glycoprotein production in vitro". *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1991; 71-79.
- 39.- Welsh MJ.: "Electrolyte transport by airway epithelia". *Phys. Rev.* 1987; 67:1143-1184.
- 40.- Potter JL., Spector S., Matthews L., Lemm.: "Studies of pulmonary secretions. III. The nucleic acids in whole pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and laryngectomy". *Am. Rev. Respir. Dis.* 1969; 99:909.
- 41.- Biserte G., Havez R., Cuvelier R.: "Glycoproteides des secretions bronchiques" *Exp. Ann. Biochim. Med.* 1963 24:85-90.
- 42.- Carnimeo N., Valerio G., Carnimeo R.: "Lysozyme activity in bronchial and broncho-alveolar fluids". *Allergol. Immunopathol.* 1985; 13:53-58.
- 43.- Reynolds HY.: "Lung inflammation: Role of endogenous chemotactic factors that attract polymorphonuclear granulocytes". *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983; 127:516-525.
- 44.- Light RW. (ed): *Clin. Chest. Med.* 1985; 6:1-176.
- 45.- Carrell RW.: " α_1 -Antitrypsin: Molecular pathology, leukocytes and tissue damage". *J. Clin. Invest.* 1986; 78:1427-1431.
- 46.- Naziruddin B., Graves DC., Reyes de la Rocha S., Sachdev J.: "Detection of distinct species in purified respiratory mucins using monoclonal antibodies". *J. Immunol. Methods.* 1991; 139:167-179.

- 47.- Perini JM. Lamblin G. Hercovics A., Roussel P.:
"Identification of human tracheo-bronchial mucin
precursors". Symp.Soc. Exp. Biol. 1989; 43:37-41.
- 48.- Puchelle E., Benis AM.: "Propriétés d'écoulement des
secretions bronchiques". Bull. Physio-path. Respir.
1971; 673.
- 49.- Respiratory Tract Mucus: "Ciba foundation Symposium 54
Amsterdam. Elsevier/North-Holland 1978.
- 50.- Ferris BG., Speizer FE., Spengler JD., Dockery D.,
Bishop YM., Wolsfon M., Humble C.: "Effects of sulfur
oxides and respiratory particles on human health.
Methodology and demography of populations in the study
Am. Rev. Respir. Dis. 1979; 120:767-779.
- 51.- Wanner A.: "The role of mucus in chronic obstructive
pulmonary disease". Chest 1990; 97(suppl.):11S-15S.
- 52.- Tomasi TB. Jr.: "Mechanisms of immune Regulation at
Mucosal Surfaces". Rev. Infec. Dis. 1983; S784-S792.
- 53.- Jerry R., Ghee Mc., Mestecky J.: "The secretory immune
system". Ann. Rev. Immunology. 1986; 4:386-410.
- 54.- Underdown BJ.; Schiff JM.: "Immunoglobulin A:
strategic defence initiative at the mucosal surface"
Ann. Rev. Immunology 1987; 389-417.
- 55.- Rademacher TW., Dwek RA.: "Structure, functional and
conformational analysis of immunoglobulin". Progress.
Immunol. 1983; 95.
- 56.- Poljak RJ.: "Three-dimensional structure and diversity
of immunoglobulin". Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant.
Biol. 1976; 41:639-655.

- 57.- Kabat EA.: " Structural concepts in immunology and immunochemistry". Holt. Rinehart and Wisnton. N. York 1976.
- 58.- Alzari PM., Lascombe MB., Poljak RJ.: "Three dimensional structure of antibodies". Ann. Rev. Immunol. 1988; 6:555-580.
- 59.- Hasemann LA., Capra JD.: "Immunoglobulins: structure functions." Fundamen. Immunology (ed. Paul WE.). New York: Raven Press 1989; 209-233.
- 60.- Turner MW.: "Structure and function of immunoglobulin" Immunochemistry: Ann. Advanced. Texbook (eds. Glynn LE Steward MW.) New York: Jhon Wiley. 1977; 1-57.
- 61.- Vaerman JP., Heremans.: "Subclasses of IgA based on differences in the polypeptide chain". Science. 1966 153:647.
- 62.- Ruseell MW., Lue C., Vandel Wall AWL. et al.: "Immunoglobulin A: molecular heterogeneity of human IgA antibodies during an immune response". Clin. Exp. Immunol. 1992; 87:1-6.
- 63.- Brandtzaeg P.: "Role of J chain an secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in human". Scand. J. Immunol. 1985; 22:111-146.
- 64.- Conley ME., Delacroix DL: "Intravascular and mucosal immunoglubulin A. two separate but related system of immune defense". Ann. Int. Med. 1987; 106:892-899.
- 65.- Strober W. et al (editors): "Recent advances in mucosal immunity". Raven Press. 1982.

- 66.- Inman FP., Mestecky J.: " The J chain of polimeric immunoglobulins". Contemp. Top. Mol. Immunol. 1974; 3:111-114.
- 67.- Koshland ME.: "The coming of age of the immunoglobulin J chain". Ann. Rev. Immunol. 1985; 3:425-453.
- 68.- Day ED.: " Avanced immunochemistry". Williams and Wilkins. 1972.
- 69.- Feinstein A., Richardson NE., Taussig MJ. : "Immuno-globulin flexibility in complement activation". Immunol. Tod. 1986; 7:169-173.
- 70.- Davies DR., Metzger H.: "Structural basis of antibodies function". Ann. Rev. Immunol" 1983; 1:87-95.
- 71.- Dixon FJ. Kunkel HG.: "Advances in immunology". Academic Press. Vol. 20 1975.
- 72.- Gehrke I., Pabst R.: "The epithelium overlying rabbit bronchus-associated lymphoid tissue does not express the secretory component of immunoglobulin A". Cell. Tissue. Res. 1990; 259:397-99.
- 73.- Kitani S., Ito K, Miyamoto T.: "IgG, IgA and IgM antibodies to mite in sera and sputs from asthamatic patients". Ann. Allergy. 1985; 55:612-620.
- 74.- Hanson LA., Andersson B., Carlsson B., Dahlgran U., Mellander L., Porras O., Svanborg Eden C., Soderstrom T.: " The secretory IgA system". Klin. Padiatr. 1985; 197: 330-333.
- 75.- Reynolds HY.: "Lung host defenses". Chest 1979; Suppl. 75S:239-242.

- 76.- Bremard-Oury C.: "Les deficits de l'immunité humorale".
Ann. Pediatr. 1989; 36:357-364.
- 77.- Soutar CA.: "Distribution of plasma cells and other
cells containing immunoglobulin in the respiratory
tract in chronic bronchitis". Thorax 1977; 32:387-396.
- 78.- Iwata M., Sato A.: "Morphological and immunochemical
studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid
tissue in rat a model chronic pulmonary infection with
P. aeruginosa". Infect. Immun. 1991; 59:1514-1520.
- 79.- Pabst R.: "The anatomical basis for the immune function
of the gut". Anat. Embryol. 1987; 176:135-144.
- 80.- Reynolds HY.: "Lung immunology and its contribution to
the immunopathogenesis of certain respiratory diseases"
J. Allergy. Clin. Immunol. 1986; 78:833-847.
- 81.- Gallin JI. Fanci AS. (editors): "Advances in host
defense mechanisms:mucosal immunity". Raven Press. 1985
- 82.- Inglis JR. (editor): "T-Lymphocytes today". Amsterdam
Elsevier 1983.
- 83.- Adams DO., Hamilton TA.: "The cell biology of
macrophage activation". Ann. Rev. Immunol. 1984;
2:283-318
- 84.- Weaver CT., Unaune ER.: "The costimulatory function of
antigen-presenting cells". Immunol. Tod. 1990; 11:49-45
- 85.- McGhee JR., Kiyono H., Michalek SM., Mestecky J.:
"Enteric immunization reveals a T cell network for IgA
responses and suggest that humans possess a common
mucosal immune system". Antonie Van Leeuwenhoek. 1987;
53:537-543.

- 86.- Riedl-Seifert RJ., Van Aubel A.: "Oral stimulation of the immune system of the mucosa". Fortschr.Med. 1990; 108:47-56.
- 87.- Nadal D., Ogra PL.: "Development of local immunity: role in mechanisms of protection against or pathogenesis of respiratory syncytial viral infections. Lung. 1990; Suppl. 168:379-387.
- 88.- Lucey Ec., Stone PJ., Breuer R.: "Mucosal immunology protection mechanisms in the airways". Eur. J. Respir. Dis. 1986; Suppl. 147:62-71.
- 89.- "Recent Development in mucosal immunology". Adv. in Exp. Med. and biology 1987.
- 90.- Ogra PL., Dayton D. (eds.): "Immunology of breast milk" Raven Press 1979.
- 91.- Szakal AK., Kosco MH., Tew JG.. "Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure-function relationship". Ann. Rev. Immunol. 1989; 7:91-109.
- 92.- Newby TJ., Stokes CR. (eds.): "Local immune response: of the gut". Boca Raton FL:CRC Press 1964.
- 93.- Watanabe N., Kato H., Mogi G.: "Induction of antigen-specific IgA-forming cells in the upper respiratory mucosa". Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1989; 97:523-529.
- 94.- Monogr. Allergy 16, 1980.
- 95.- Ogra, Bienestock.(eds.) "Mucosal immune system in health and disease". 81^aRoss conference on pediatric. Research 1981.
- 96.- Osmond DG.: "Population dynamics of bone marrow B lymphocytes". Immunol. 1986; 93:103-124.

- 97.- Cambier JC., Ransom JT.: "Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes". *Ann. Rev. Immunol.* 1987; 8:175-199.
- 98.- Clark EA., Lane P.J.L.: "Regulation of human B-cell activation and adhesion". *Ann. Rev. Immunol.* 1991; 9:97-127.
- 99.- Vitetta ES., Fernandez-Brotan R., Myers CD., Sanders VM.: "Cellular interactions in the humoral response". *Advances in immunology Vol 45* (ed. Dixon FJ.) London Academic Press 1989.
- 100.- Kishimoto T., Hirano T.: "B-lymphocytes activation, proliferation, and immunoglobulin secretion". *Fundamental Immunology 2nd edn.* (ed Paul WE) New York Raven Press 1989; 385-411.
- 101.- Takatsu K.: "B-cell growth and differentiation factors". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1988; 188:243-258.
- 102.- Kincade PW.: "Experimental models for understanding B- lymphocytes formation". *Advances in Immunology vol 41* New York Academic Press 1987; 181-267.
- 103.- Unaune E., Allen P.: "The basis for immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells". *Science* 1987; 236:551-557.
- 104.- Unaune ER., Cerrottini JC.: "Antigen presentation". *FASEB J.* 1989; 3:2496-2505.
- 105.- Unaune E.: "Macrophages, antigen presenting cells and the phenomena of antigen handing and presentation". *en: Fundamental Immunology 2 end* (ed Paul WE) New York, Raven Press.
- 106.- Sela M. (ed.): "The antigens". Vols. 1-7 New York Academic Press 1973-1987.

- 107.- Reth M.: "Antigen receptors on B lymphocytes". Ann. Rev. Immunol 1992; 10.
- 108.- Cambier JC., Ramson JT.: "Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes" Ann. Rev. Immunol. 1987; 5:175-199.
- 109.- Monroe JG., Haldar S.: "Involvement of a specific guanine nucleotide binding protein in receptor immunoglobulin stimulated inositol phospholipid hidrolysis". Biochem. Biophys. Acta 1989; 1013:273-278.
- 110.- Golub ES.: "Immunology: A synthesis". Suderland MA: Sinauer Associates 1987.
- 111.- Jerne NK.: "The natural selection theory of antibody formation". Proc. Natt. Acad. Sci. USA 1955 41:489.
- 112.- Litman GW., Shamblott MJ., Haire RN., Amemiya CT.: "Phylogenetic origins and diversification of immunoglobulin genes". en Defenses molecules (eds. Marchalonis JJ., Reinisch CL.) New York Alan R. Liss 1990; 281-294.
- 113.- Brodsky F.: "Cell biology of antigen processing and presentation". Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:707-744.
- 114.- Steinman RM.: "The dendritic cell system and its role in immunogenicity". Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-296.
- 115.- Berzofsky JA., Brett SJ., Streicher HZ., Takahashi H.: "Antigen processing for presentation to T lymphocytes: function, mechanisms and implication for the T cell repertorie". Immunol Rev. 1988; 105:5-31.
- 116.- Klaus GGB., Humphrey JH.: "The fate of antigens".en Clinical aspects of immunology 5th. edn. (eds. Lachman PJ., Peters DK.) Oxford: Blackwell Scientific Publications 1989.

- 117.- Lorenz RG., Allen PM.: "Processing and presentation of self proteins". Immunol. Rev. 1988; 106:115-127.
- 118.- Nossal GJV., Ada GL.: "Antigens, lymphoid cells and the immune response". New York. Academic Press. 1971.
- 119.- Schwartz A: "Cell biology of intracellular protein trafficking". Ann. Rev. Immunol. 1990; 8:195-229.
- 120.- Allen PM.: "Antigen processing at the molecular level". Immunol. Tod. 1987; 8:270-273.
- 121.- Nisonoff A.: "Introduction to molecular immunology". 2 end. edition: Baltimore Sinauer Association Inc.
- 122.- Margni RA.(ed.): "Inmunologia e inmunoquimica" 4 ed. Panamericana Buenos Aires Argentina 1989.
- 123.- Muller G.(ed.): "Ummunol Rev. 1985; 83.
- 124.- Murphy DB., Herzenberg LA., Okumura K., Herzenberg L., McDevitt H.: "A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controlling determinants on suppressor T lymphocytes". J. Exp. Med. 1974; 144:699-712.
- 125.- Gallagher RE. (ed.): "T-cell development". Immunol. Tod 1991; 12:65-92.
- 126.- Möller G. (ed.): "T-helper cell subpopulations". Immunol. Rev. 1991; 123:5-229.
- 127.- Dinarello CA.: "Interleukin-1 and its biologically related cytokines". Avd. Immunol. 1989; 44:153-206.
- 128.- Dower SK., Qwarnstrom EE., Page RC., et al:"Biology of the IL-1 receptor": J. Invest. Dermatol. 1990; 94:68-73.

- 129.- Kuzziel WA., Greene WC.: "Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor: new insights into structure and function". J. Invest. Dermatol. 1990; 94:27S-32S.
- 130.- Pfeffer LM. (ed.): "Mechanisms of interferon action". 2 vols. Boca Raton FL: CRC Press 1989.
- 131.- Schrader JW., Clark-Lewis I., Crapper RM. et al: "The physiology and pathology of pan-specific hemoporetin (IL-3)". en: Lymphokines vol 15 London: Academic Press 1988; 281-311.
- 132.- Mosmann T. Zlotnik A.: "Multiple functions of IL-4 and its role in immune regulation". en: Growth factors differentiations factors and cytokines (ed. Habenicht A.) Berlin Springer-Verlag 1989; 126-146.
- 133.- Möller G. (ed.): "IL-4 and IL-5: biology and genetics" Immunol. Rev. 1988; 102.
- 134.- Kishimoto T.: "The biology of interleukin 6". Blood. 1989; 74:1-10.
- 135.- Honj T., Alt FW., Rabbitts T.(eds.): "Immunoglobulin genes". San Diego: Academic Press 1988.
- 136.- Kincade PW., Gimble JM.: "B lymphocytes". en Fundamental immunology 2nd. edn. (ed. Paul WE.) New York Raven Press 1989; 41-67.
- 137.- Diggs LW., Sturm D., BellA.: "The morphology of the cell of human blood". Abbott Laboratories. North Chicago 1971; 12-15.

- 138.- Melchers F.: "The many role of immunoglobulin molecules in the development and growth control of the B lymphocyte lineage". en Immunoglobulin genes (eds. Honjo T., Alt FW., Rabbitts T.) New York Academic Press 1989; 23-44.
- 139.- Williamson AR., Askonas BA.: "Biosynthesis of immunoglobulins: the separate classes of polirribosomes synthesizing heave and light chains". J. Mol.Biol. 1967 23:201-210.
- 140.- Horbart MJ. MC Conner J. (ed.): "The immune system". Blackwell Sci. Publ. Oxford 1975.
- 141.- Hendershot L., Bole D., et al.: "Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttrans-lationally with immunoglobulin heavy chain binding protein". J. Cell. Biol. 1987; 104:761-767.
- 142.- Standt LM., Lenardo MJ.: "Immunoglobulin gene transcription". Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:373-398.
- 143.- Honjo T., Shimuzi A., Yaoita Y.: "Constant-region of the immunoglobulin heavy chain and the molecular mechanism of class switching". en: Immunoglobulin Gene (eds. Honjo T., Alt FW., Rabbitts T.) New York. Academic Press. 1989; 123-149.
- 144.- Esser C., Radbruch A.: "Immunoglobulin class switching: Molecular and cellular analysis". Ann. Rev. immunol. 1990; 8:717-735.
- 145.- Brandtzaeg P., Krajñci P., Kvale D., Sollid LM.: "Secretory component as a polymeric-Ig receptor: structural and functional aspects". en: Highlights in modern biochemistry. vol 2. (eds Kotyk A., Skoda J., Paces V., Kosta V.) Zeist: VPS international science publishers. 1989; 1255-1266.
- 146.- Daniel P., Stobo J., Wells JV.: "Basic and clinical immunology". (eds. Apleton J., Lange R.) Prentice-hall 1987; 156-163.

- 147.- Snyderman R., Uhing R.: "Phagocytic cell:stimulus response coupling mechanisms". en: Inflammation basic principles and clinical correlates". (eds. Gallin JI., Goldstein IM., Snyderman R.) New York Raven Press.1989 309-324.
- 148.- Nathans CF., Cohn ZA.: "Cellular components of inflammation: monocytes and macrophagos". en: Textbook of Rheumatology 2end. edn. (eds. Kelley V. Harris E., Ruddy S., Sledge R.) Philadelphia: W.B. Saunders 1985 144-179.
- 149.- Blatz R. Linde K.: "Modulating of medical microbiology of the gastrointestinal tract by oral administration of defined E. Coli strains. Influencing the epitope by means of metabolic drift mutants of E. Coli". Acta Microbiolo. Hung. 1990; 37:145-153.
- 150.- Reynolds HY.: "Bacterial adherence to respiratory tract mucosa: a dinamic interaction leading colonization". Semin. Respir. Infect. 1987; 2:8-19.
- 151.- Samra NK., Ganguly HK., Mahajan RC.: "Human milk containing specific secretory IgA inhibits binding of Giardia Lamblia to nylon and glass surfaces". J. Diarrhoeal. Dis. Respir. 1991; 2:100-103.
- 152.- Hatcher R.: "Primer on allergic and immunologic diseases". en: Journal of the American Medical Association vol 258 (eds. Lockey R., Bukantz S.) 1987; 12-24.
- 153.- Abu-Ghazaleh RI., Fijisawa T., Mestecky J., Kyl RA., Gleich GJ.: "IgA-induced eosinophil degranulation". J. Immunol. 1989; 142:2393-2400.
- 154.- Otten HG., Daha MR., Van Laar JM., De Rooy HH., Breedveld FC.: "Subclass distribution and size of human IgA rheumatoid factor at mucosal and nomucosal sites". Arthritis Rheuma. 1991; 34:831-839.

- 155.- Verhelst F., Demedts M., Verschakelen J., Verbeken E., Marien K., Peters C.: "Adult linear IgA bullous dermatosis with bronchial involvement". Br. J. Dermatol 1987; 116:587-590.
- 156.- Thurlbeck WM.: "Aspects of chronic airflow obstruction" Chest 1978; 72:314-349.
- 157.- Marthay RA.: "The medical clinics of north america obstructive lung disease" (ed. Saunders WB.) 1981 63:453-706.
- 158.- American Thoracic Society. A Stament. Bt the Commitee on Diagnostic Standards for Non- Tuberculous Respiratory Siseases: Chronic Bronchitis, Asthma and Pulmonary Emphysema. Am. Rev. Respir. Dis. 1973; 108:1043-1065.
- 159.- Ciba Guest Symposium Report. Terminology and Clasification of Chronic Pulmonary Emphysema and Related Conditions. Thorax 1959; 14:286-296.
- 160.- Crofton JW., Douglas A.: "Respiratory diseases". 2d. ed Oxford Blackwell 1975; 329-359.
- 161.- Broshear RE.: "Chronic obstructive pulmonary diseases" en: Current Pulmonology vol 2 (ed. Simmons DH.) Houston Mifflin Boston professional Publisher Medical Division. 1980.
- 162.- Fiore MC., Novotny TE., Pierce JP., Hatziaandreu EJ., Patel KM., Davis RM.: "Trends in cigarretes smoking in the united states: the changing influence of gender and race. JAMA 1989; 261:49-55.
- 163.- Peto R., Speizer FE., Cochrane AL., Moore F., Fletcher CM., Tinker CM., Higgins ITT., Gray RG., Richards SM., Gilliland J., Norman Smith B.: "The relevance in adults of airflow obstructions, but not of mucus hiper-secretion, to mortality from chronic lung disease". Am. Rev. Respir. Dis. 1983; 128:491-500.

- 164.- The health Consequences of Smoking.Chronic Obstructive Lung Diseases. A report of the Surgeon General 1984
Dept H.H.S. PHS Office on Smoking Rockville MD.
- 165.- Pusa T., Tcherzewski H.: "Analysis of proteolytic enzymes and their natural inhibitors in serum and bronchial lavage fluid in atopic bronchial asthma cronic bronchitis and pneumonia". Allerg. Immunol. 1985; 31:169-175.
- 166.- Ferris BG., Speizer FE., Spengler JD., Dockery D., Bishop YM., Wolfson M., Humble C.: "Effects of sulfur oxides and respiratory particles on human health. Methodology and demography of populations in the study" Am. rev. respir. Dis. 1979; 120:767-779.
- 167.- Tager IB., Speizer FE.: "Role of infection in chronic bronchitis". N. Engl. J. Med. 1975; 292:563-571.
- 168.- Morgan WKC., Seaton A.: "Occupational lung diseases". Philadelphia Saunders 1975; 265-273.
- 169.- Reid LM.: "The pathology of obstructive and inflammatory airway disease". Eur. J. Respir. Dis. 1986 147:26-37.
- 170.- Anderson JR.: "Muir's texbook of pathology". 2nd ed. (ed. Arnold A.) 1982: 515-517.
- 171.- Reid L.: "Measurement of the bronchial gland layer; a diagnostic yardstick in chronic bronchitis". Thorax 1960; 15:132.
- 172.- Weir EK., Revvees JT.: "Pulmonary hypertension" New York Futura 1984.
- 173.- Joyce SM.: "Sputum analysis and culture". Ann. Emerg. Med. 1986; 15:325-328.

- 174.- Lafitte JJ., Laine A., Hayem A., Petiprey D., Rousel P. Degand P.: "Les secretions bronchiques. etude biochimique. Aspects physio-pathologiques". Eur. J. Respir. Dis. 1980; 61 Suppl. 111:25-28.
- 175.- Reid LM., Jones RC.: "Experimental chronic bronchitis". Internat. Rev. Exp. Pathol. 1983; 24:335-382.1
- 176.- Brogan TD., Ryley HC., Allen L., Hutt H.: "Relation between sputum sol phase composition and diagnosis in chronic chest diseases". Thorax 1971; 26:418-423.
- 177.- Weisse AB.: "Contralateral effects of cardiac disease affecting primarily either the left or right chambers of the heart". Fundamentals of clinical cardiology. 1974; 5:654-660.
- 178.- Perezagua C., Diaz Rubido E.: "Investigacion de 16 fracciones proteicas en el moco bronquial en la bronquitis crónica". Rev. Clin. Esp. 1973; 128:389.
- 179.- Higgins MW., Keller JB.: "Estimating your patient's risk of COPD". J. Respir. Dis. 1983; 4:97-108.
- 180.- Singer DB., Greenberg SD., Harrison GM.: "papillomatosis of the lung" Am. Rev. respir. Dis. 1866 94:777.
- 181.- Mac Donald JR., Harrington SW., Clagge OT.: "Hamartoma (often called chondroma) of the lung". J. Thorac. Surg. 1945; 14:128.
- 183.- Alvarez Gago T.: "Tumores de pulmon y pleura" en: "Anatomia patologica" (eds. Fariña J. et al). 1990.523-533.
- 184.- Wynder EL., Graham EA.: Tobacco smoking as a possible factor in bronchogenic carcinoma: a study of 684 proved cases". JAMA 1950; 143:329-336.

- 185.- Adams JD., Brunnemann KD., Hofman D.: "Rapid method for the analysis of tobacco specific N-nitrosamines by gas liquid chromatography with a thermal energy analyzer". J. Chromatogr. 1983; 256:347-351.
- 186.- Lynch HT., Kimberling WJ., Markvicka SE et al: "Genetic and smoking-associated cancers: a study of 485 families" Cancer 1986; 57:1640-1646.
- 187.- Heigway J., Thatcher N., Cerny T., Hasleton PS.: "Genetic predisposition to human lung cancer". Br. J. Cancer 1986; 53:453-457.
- 188.- Berry G., Newhouse ML., Antonis P.: "Combined effect of asbestos and smoking on mortality from lung cancer and mesothelioma in factory workers". Br. J. Ind. Med. 1985; 42:12-18.
- 189.- Doll R., Peto R.: "The causes of cancer" JINCI 1981 60:1191.
- 190.- Blot WJ., Fraumeni JF Jr.: "Arsenical air pollution and lung cancer". Lancet 1975; 2:142-144.
- 191.- Doll R., Morgan LG., Speizer FE.: "Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers" Br. J. Cancer. 1970; 24:623-632.
- 192.- Weis W., Boucot KR.: "The respiratory effects of chloromethyl methyl ether". JAMA 1975; 234:1139-1142.
- 193.- Yamada A.: "Patho-anatomical studies on respiratory cancers developed in workers with occupational exposure to mustard gas". Hiroshima Med. J. 1959; 7:719-761.
- 194.- Samet JM.: "Radon and lung cancer". J. Natl. Cancer Inst 1989; 81:745-757.

- 195.- Hoover R.: "Epidemiology, tobacco and geographic pathology" en: Pathogenesis and Therapy of Lung Cancer. (ed. Harris CC.) New York 1978; 3-24.
- 196.- Langman J.: "Medical embryology" (eds. Williams and Wilkins Co.) Baltimore 1976; 36-45.
- 197.- Yesner R.: "Classification of lung cancer histology". N. Engl. J. Med. 1985; 312:652-653.
- 198.- Greenberg SD., Fraire AE., Kinner BM., Johnson EH.: "Tumor cell type versus staging in the prognosis of carcinoma of the lung". Pathol Annu. 1987; 22:387-405.
- 199.- Yesner R.: "Spectrum of lung cancer and ectopic hormones". Pathol. Ann. 1978; 13:217-240.
- 200.- Mundy GR., Ibbotson KJ., Simpson EL., Jacobs JW., Martin Tj.: "The hypercalcemia of cancer". N. Engl. J. Med. 1984; 310:1718-1727.
- 201.- Odell WD., Wolfson AR.: "Hormones from tumors: are they ubiquitous?". Am. J. Med. 1980; 68:317-318.
- 202.- Fidler IF.: "The Ernst W. Bertner Memorial Award Lecture: The evolution of biological heterogeneity in metastatic neoplasms". en: Cancer Invasions and Metastasis; Biologic and Therapeutic Aspects. (eds. Nicolson GL., Milas L.) New York Raven Press 1984; 5-26.
- 203.- Madri J., Carter D.: "Scar cancers of the lung: origin and significance". Hum Pathol. 1984; 15:625-631.
- 204.- Ginsbrug RJ., Feld RJ.: "IV world conference on lung cancer". Chest 1986; 89 Suppl. 1995-3.685.
- 205.- Shield TW.: "Surgery of small cell lung cancer". 1986; 89 Suppl. 264-267.

- 206.- Barnard WE.: "The nature of the [oat cell sarcoma] of the mediastinum". J. Pathol. Bact. 1926 29:241-244.
- 207.- Carney DN.: "Recent advances in the biology of small cell lung cancer". Chest 1986; 89:2535-2575.
- 208.- Gewirtz G. Yalow RS.: "Ectopic ACTH production in carcinoma of the lung". Clin. Invest. 1974; 53:1022-1032.
- 209.- Yesner R.: "Large cell carcinoma in the lung". en: Seminars in Diagnostic Pathology (ed. Santa Cruz DJ.) New York Grune and Stratton 1985; 225-269.
- 210.- Tao LC., Weisbrod GL., Pearson FG., Sanders DE., Donat EE., Filipetto L.: "Cytologic diagnosis of broncioloalveolar carcinoma by fineneedle aspiration biopsy". Cancer 1986; 57:1565-1570.
- 211.- Merril W., Barwick K., Madrid J., Strober W., Matthay A., Olchowski J., Naegel G., Reynolds H.: "Bronchial lavage proteins as correlates of histopathologic airway changes in healthy smors and patients with carcinoma". Am. Rev. Resp. Dis. 1984; 130:905-910.
- 212.- Bunn PA., Carney DN., Gazdar AF., Whang-Peng J., Mattehews MJ.: "Flow cytometric DNA content analysis in lung cancer: diagnostic and biologic implications". Cancer Res. 1983; 43:5026-5032.
- 213.- Filderman AE., Shaw C., Mathay R.: "Lung cancer Part I: Etiology, Pathology, Natural History, Manifestations and Diagnostic thchniques". Invest. Radiol. 1986; 21:80-90.
- 214.- Fontana RS. "Early diagnosis of lung cancer". Am. Rev. respir. Dis 1977; 116:399-402.

- 215.- Melamed M., Flehinger B., Miller D., et al:
"Preliminary report of the lung cancer. Detection
program in New York". Cancer 1977; 39:369-382.

- 216.- Levin ML., Tockman MS., Frost JK., Ball WC.: "Lung
cancer mortality in males screened by chest x-ray
and cytologic sputum examination". A preliminary
report recent results". Cancer 1982; 82:138-146.

- 217.- Gail MH., Muenz L., McIntire KR. et al: "Multiple
markers for lung cancer diagnosis. validation of
models for localized lung cancer". JNCI 1988;
80:97-101.

- 218.- Vicent RG., Chu TM., Lane WW. et al: "Carcinoembryonic
antigen as monitor of successful surgical resection
in 130 patient with carcinoma of the lung". Prog.
Cancer Res. Ther. 1979; 11:191-198.

- 219.- Iglehart JD., Michael JS., Warzynski PHD., Ronald C.
Montelaro PHD. Bolognesi DP., Sabiston DC.Jr., Wolfe
WG., Durham NC.: "Function of the secretory immune
system in bronchogenic carcinoma" J. Thorax Cardio.
Surg. 1981; 82:63-69.

- 220.- Mandel MA., Kenneth MD., Dvorak MD., Leonard W.,
Worman MD., Jeroma J., DeCosse MD.: "Immunoglobulin
in the bronchial washing of patients with benign
and malignant pulmonary disease". N. J. Engl. Med. 1976
23:694-698.

- 221.- Lustig ES., Matos E., Spector C., Scheitman B., Diaz A.
"Secretory IgA content in human normal and tumoral
bronchial mucosa in vitro". Oncology 1980; 37:16-19.

- 223.- Burdash N. et al: "Methods of immunoglobulin
quantitation compared". Clin. Chem. 1980; 27:345-347.

- 224.- Mancini G., Carbonara O., Heremans JF.: "Immunochemical
quantitation of antigens by single radial immuno-
diffusion". Immunochemistry 1965; 2:235.

- 225.- Fahey JL., McKelvey EM.: "Quantitative determination of serum immunoglobulin in antibody-agar plates". J. Immunol. 1965; 94:84.
- 226.- Blanchard GC., Gardner R.: "Two nephelometric methods compared with a radial immunodiffusion method for the measurement of IgG, IgA, and IgM". Clin. Biochem. 1980; 24:808-814.
- 227.- Laurell Cb.: "Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies" Anal. Biochem. 1966; 15:45-52.
- 228.- Goldman M.: "Flourescent antibody Methods" Academic Press 1968.
- 229.- Finley PR. et al: "Immunochemical determination of human immunoglobulins: use of kinetic turbidimetry and a 36-place centrifugal analyzer". Clin. Chem. 1979; 25:526-530.
- 230.- Wisdom GB.: "Enzyme immunoassays". Clin. Chem. 1976; 22:1243.
- 231.- Laurell CB.: "Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in antibody-containing agarose gel". Protides. Biol. Fluids. Proc. Colloq. 1966; 14:499-502.
- 232.- Ingild A.: "Single radial immunodiffusion". Scan. J. Immunol. 1983; 10:41-56.
- 233.- Ouchterlony O., Nilsson A.: "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis". In: Handbook of experimental immunology. (eds. Brecher G.) Blackwell cap. 19 1973.
- 234.- Rose N., Friedman H.: "Manual of clinical immunology" (ed. American Society of Microbiology" cap. 14 1984.

- 235.- Pesce A., Kaplan L.: "Methods in Clinical Chemistry" (eds. Mosby CV. co.) Cincinnati Ohio 1987; Ap. B.
- 236.- Heer EE., Margni R.: "Electro e inmunoelectroforesis" (ed. Fernandez G.) Buenos Aires 1971.
- 237.- Castella J., Llorente JL., Puzo MC., Sanchis J., Xaubet A.: "Normativa sobre la practica del lavado bronco-alveolar (BAL)" (ed. Doyma S.A.) Barcelona 1989.
- 238.- Rowe DS., Grab B., Anderson SG.: "An international reference preparation for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM". Bull. WHO. 1970; 42:535.
- 239.- Lowry HO., Rosebrough NJ., Farr AL., Randal RJ.: "Protein measurement with the Folin reagent" J. Biol. Chem. 1951; 193:265-275.
- 240.- Hunninghake GW., Gadek JE., Kawanami O., Ferrans VJ., Crystal RG.: "Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease:evaluation by bronchoalveolar lavage" Am. J. Pathol. 1979; 97:149-206
- 241.- Pingleton SK., Harrison GF., Stechschulte DJ., Wesselius LJ., Kerby G., Ruth WE.: "Effect of location, Ph and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers". Am. Rev. Respir. Dis. 1983; 128:266-270.
- 242.- Cherniack RM.: "The Bal cooperative group steering committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis and selected comparison groups". Am. Rev. Respir. Dis. 1990; 141:169-202.
- 243.- Venzel SE., Westcoott JY., Smith HR., Larsen GL.: "Spectrum of prostanoid release afeter bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control group: an alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediator".Am. Rev. Respir. Dis. 1989; 139:450-457.

- 244.- Bernstein IL., Boushey HA., Cherniack RM.et al:
"Summary and recommendations of a workshop on the
investigative use of fiberoptic bronchoscopy and
bronchoalveolar lavage in asthmatic patients".
Am. Rev. Respir. Dis. 1985; 132:180-182.

- 245.- Rankin A., Naegel G., Schrader E., Matthay A., Reynolds
HY.: "Air.space immunoglobulin production and levels
in bronchoalveolar lavage fluid of normal subjects and
patients with sarcoidosis". Am. Rev. Respir. Dis. 1983
127:442-448.

- 246.- Wiggins J., Hill SL., Stockley RA.: "The secretory IgA
system of lung secretions in chronic obstructive
bronchitis: comparison of sputum with secretions
obtained during fiberoptic bronchoscopy". Thorax 1984;
39:517-523.

- 247.- Gleen A., Warr R., Russell M., Sharp PM., Rossen R.:
"Normal human bronchial immunoglobulins and proteins"
Am. Rev. Respir. Dis. 1977; 116:25-30.

- 248.- Michell FB., Godard P., Bousquet J.: "Usefulness of
bronchoalveolar lavage in asthmatics". Int. Arch.
Allergy. Appl. Immunol. 1989; 88:101-107

- 249.- Godard PH., Chaintreuil J., Damon M., Copu M., Flandre
O., Crastes de Paulet A., Michel FB.: "Functional
assessment of alveolar macrophages: comparison of
cells from asthmatics and normal subjects". J. Allergy.
Clin. Immunol. 1982; 70:88-93.

- 250.- Callol L., Laguna R., Martinez R., Caro de Miguel MC.,
Gomez de Terreros FJ.: "¿Que es el lavado bronco-
alveolar?". Enf. Torax 1984; 33:135-139.

- 251.- Delacroix DL., Marchandise FX., Francis C.: "Alpha-2-
macroglobulin immunoglobulin A, and immunoglobulin M in
bronchoalveolar lavage". Am. Rev. Respir. Dis. 1985;
132:829-835.

- 252.- Biserte G., Chrétien J., Voisin C.: "Le lavage broncho-alveolaire chez l'homme". (ed. INSERM). Institut National de la sante et de la recherche medicale. Paris 1979; vol 84.
- 253.- Andersen HA.: "Diagnostic and therapeutic application of the broncoscope". Chest. 1978; 73 Suppl. 1978.
- 254.- Pereira W., Kovnat DM., Snider GL.: "A prospective cooperative study of complications following flexible fiberoptic bronchoscopy". Chest 1978; 73:813-816.
- 255.- Dulfano MJ.: "Sputum. fundamentals and clinical pathology" (ed. Thomas CC.) Springfield. 1978.
- 256.- Joyce SM.: "Sputum analysis and culture". Ann. Emer. Med. 1986; 15:325-328.
- 257.- Reimer CB., Madison SE.: "Standardization of human immunoglobulin quantitation: a review of current status and problems". Clin. Chem. 1976; 22:577-582.
- 258.- Daniel JC., et al: "Methodologic differences in values for M-proteins in serum, as measured by three techniques". Clin. Chem. 1975; 21:243-248.
- 259.- Burr WR. (ed.): "Practical immunoassays. the state of the art". Dekker 1984. 71-101.
- 260.- Alexander RL.: "Comparison of radial immunodiffusion and laser nephelometry for quantitating serum protein" Clin. Chem. 1980; 26:314-317.
- 261.- Feinberg JG.: "A new device for immunoprecipitation in agar gels". Nature 1964; 201:631-632.
- 262.- Scheidegger JJ.: Int. Arch. Allergy. 7:103 1955.

- 263.- Stockley RA., Burnett D.: "Local IgA production in patients with chronic bronchitis: effects of acute respiratory infection". Thorax 1980; 35:202-206.
- 264.- Pisani RJ., Denis MD., Cortese A., Homburger HA., Grambsch P.: "A prospective pilot study evaluating the effectiveness of secretory IgA measurement in bronchoalveolar lavage to detect non-small cell lung cancer". Chest 1990; 97:586-589.
- 265.- Miller MV. (ed.): "Technical manual" American Association of Blood Banks. Philadelphia 1977.
- 266.- Davis GS., Giancola MS., Constanza Mc., Low RB.: "Analyses of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers". Am. Rev. Respir. Dis. 1982; 126:611-616.
- 267.- Merril W., Marcy TA., Reynolds HT.: "Bronchoalveolar lavage: clinical role and quantitative assessment". Respiration 1988; 54:3-8.
- 268.- Falk GA., Okinaka AJ., Siskind G.: "Immunoglobulins in the bronchial washing of patients with chronic obstructive pulmonary disease". Am. Rev. Respir. Dis. 1972; 105:14-21.
- 269.- Clarke CW.: "Aspects of serum and sputum antibody in chronic airways obstruction". Thorax 1976; 31:702-706.
- 270.- Low RR., Gerald D., Giancola M.: "Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluids of healthy human voluntter smokers and nonsmokers". Am. Rev. respir. Dis 1978; 118:863-873.
- 271.- Stocley R. Afford S., Burnett D.: "Assessment of 7S and 11S immunoglobulin A in Sputum". Am. Rev. Respir. Dis. 1980; 122:959-964.

- 272.- Bauer W., Gorny MK., Morrell A. Baumann HR.: "Bronchoalveolare immunoglobuline bei Sarkoidosis". Schweiz. Med. Wochenschr. 1985; 115:103-105.
- 273.- Neffen H., Crisci CD., Busaniche H.: "Correlation between serum IgA, secretory IgA and total serum IgE in asthmatic and rhinitic affected patients". Allergol. Immunopathol. 1986; 14:413-418.
- 274.- Lemaire E., Renoux M.: "Donnees immunologiques fournies par lavage alveolaire en pathologie tumorale broncho pulmonaire". Rev. Mal. Resp. 1987; 4:11-16.
- 275.- Rogoz S., Voiculescu C., Rosu L., Tatulescu M., Dragota M.: "Variatia concentratiilor de imunoglobuline A secretorii in afectiuni respiratorii cronice cu componenta infectioasa". Pneumonol. Pol. 1987; 55:519-523.
- 276.- Misiewicz A.: "Changes in serum immunoglobulin levels in patients with chronic bronchitis exposeda nitous oxide". Pneumol. Pol. 1988; 56:111-117.
- 277.- Wesseluis LJ., Dark SD., Hanson FN., Wheaton DL.: "Airway secretory IgA concentrations in patients with lung cancer". Chest 1989; 95:1265-1268.
- 278.- Chauhan Gupta MK., Goyal A., Dasgupta DJ.: "Alterations in immunoglobulin and complement levels in chronic obstructive pulmonary disease". Indian. J. Med. Res. 1990; 92:241-245.
- 279.- Taylor DC., Cripps AW., Clancy RL.: "Inhibition of adhesion of haemophilus influenzae to buccal cells by respiratory secretions". Immunol. Cell. Biol. 1990; 68:335-342.
- 280.- Kurono Y., Shimamura K., Shigemi H., Mogi G.: "Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions". Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1991; 100:455-458.

- 281.- Ammann AJ., Hong R.: "Selective IgA deficiency: presentation of 30 cases and a review of literature". Br. J. Med. 1967; 50:223-270.
- 282.- Takemura T., Kishi Y.: "Distribution of secretory component and immunoglobulins in the developing lung". Am. Rev. Respir. Dis. 1985; 131:125-130.
- 283.- Jardin F., Gueret P., Prost JF., Farcot JC., Ozier Y., Bourdarias JP.: "Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular function in chronic obstructive pulmonary disease". Am. Rev. Respir. Dis. 1984; 129:135-142.
- 284.- Doll R., Peto R.: "Mortality in relation to smoking: 20 years observations on male british doctors". Br. Med. J. 1976; 2:1525-1536.
- 285.- Martin RR.: "Altered morphology and increased acid hidrolase content of pulmonary macrophages from cigarettes smoking". Am. Rev. Respir. Dis. 1973; 107:596-603.
- 286.- Plusa T., Wasek Z.: "Immunochemical evaluation of bronchoalveolar lavage in atopic bronchial asthma, chronic bronchitis and bronchiectasis". Allergol. Immunopathol. 1987; 15:209-213.
- 287.- Kopneva TN., Makarova OV., Khomenko LP.: "Immunnaia sistema legkikh v norme i pri khronicheskikh nespersificheskikh zabolevaniakh". Arkh. Patol. 1986 48:86-90.
- 288.- Schultek T., Braun J., Wiessmann KJ., Wood WG.: "IgA-konzentration in serum, sputum und broncho-alveolarer lavage bei chronischer bronchitis". Dtsch. Med. Wochenscher 1987; 112:1611-1614.

- 289.- Kononov AV., Nepomniashchikh GI., Zinov'nev AS.: "Immunologicheskie reaktsii alizistoi obolochki bronkhov v morfogeneze khronicheskogo bronkhita". Arkh. Patol. 1987; 49:32-40.
- 290.- Barker AF., Craig S., Bardana KJ. Jr.: "Humoral immunity in bronchiectasis". Ann. Allergy. 1987; 59:179-182.
- 291.- Nagy B., Marodi L., Jezerniczky J., Karmazsin L.: "Immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid of children with recurrent obstructive bronchitis". Acta Paediatric. Hung. 1986; 27:205-210.
- 292.- Burnett D., Hill SL., Bradwell AR., Stockley RA.: "IgA subclasses in sputum from patients with bronchiectasis". Respir. Med. 1990; 84:123-127.
- 293.- Burnett D., Crocker J., Stockley RA.: "Cells containing IgA subclasses in bronchi of subjects with and without chronic obstructive lung disease". J. Clin. Pathol. 1987; 40:1217-1220.
- 294.- Winder NC., Von Fellenberg R.: "Immunofluorescent evaluation of the lower respiratory tract of healthy horses and of horses with chronic bronchiolitis". Am. J. Vet. Res. 1986; 47:1271-1274.1.
- 295.- Thulrbeck MW.: "Smoking, airflow limitation and the pulmonary circulation". Am. Rev. Respir. Dis. 1980; 122:183-186.
- 296.- Sande M., Hudson L., Root R. (eds.): "Respiratory infection". Cuhrchill Livingstone. New York 1986.
- 297.- Fishman AP.: "Dynamics of the pulmonary circulation" en Handbook of Physiology", sect 2: circulations vol. 2 (eds. Hamilton WF., Dow P.) Whashington DC. Am. Phyl. Society. 1963; 1667-1743.

- 298.- Weisse AB.: "Contralateral effects of cardiac disease affecting primarily either the left or right chambers of the hearth"Am. Hearth. J. 1974; 5:654-660.
- 299.- Brogan TD., Ryley TC., Allen L., Hutt H.: "Relation between sputum sol phase composition and diagnosis in chronic chest diseases". Thorax 1971; 26:418-423.
- 300.- Slutsky R. et al: "Right and left ventricular dysfunction in patients with chronic obstructive lung disease". Am. J. Med. 1980; 68:197-205.
- 301.- Minna JD., Pass H., Gltstein E., Ihde Dc.: " "Cancer of the lung" en:Cancer: principles and practice of oncology. (eds.De vita V. Jr., Hellman S., Rosenberg SE.) Lippincott Co. Philadelphia 1989; 591-705.
- 302.- Iannuzzi MC., Scoggin CH.: "Small cell lung cancer". Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134:593-608.
- 303.- Smoking and Health: A report of the advisory committee to the SurgeonNs General of the Public Health Service. US Departament of Health, Education and Welfore. Public Health Service. 1979 Publication 1103.
- 304.- Cantrell ET., Warr GA., Busbee DL.: "Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in human pulmonary alveolar macrophages by cigarette smoking". J. Clin. Invest. 1973 52:1881-1884.

=====